

121,017
attach
Puber
#32

NEW POLYPEPTIDE

Patent Number: JP2227075

Publication date: 1990-09-10

Inventor(s): SASAKI KATSUTOSHI; others: 04

Applicant(s): KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD

Requested Patent: JP2227075

Application Number: JP19890253097 19890928

Priority Number(s):

IPC Classification: C12N9/72 ; C07K13/00 ; C07K15/14 ; C12N1/21 ; C12N5/10 ;
C12N9/64 ; C12N15/27 ; C12N15/58 ; C12N15/70 ; C12N15/85 ; C12P21/02

EC Classification:

Equivalents: JP2928287B2

Abstract

PURPOSE: To efficiently produce polypeptide by culturing host cell transformed with plasmid including DNA coding polypeptide having amino acid sequence capable of adding at least one saccharides.

CONSTITUTION: Plasmid having amino acid sequence capable of adding at least one new saccharides and containing DNA coding polypeptide capable of adding saccharides by amino acid-substitution, amino acid-omitting or amino acid- inserting to polypeptide is prepared. Host cell is transformed using said plasmid and the transformant is cultured in medium to accumulate polypeptide or glycosylated polypeptide in the cultured matter. Next, polypeptide or glycosylated polypeptide is collected from the cultured matter.

121.017

31周文前2

attach
paper
#32

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

平2-227075

⑬ Int. Cl.³

C 12 N 9/72
C 07 K 13/00
15/14

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)9月10日

7823-4B
8318-4H
8318-4H※

審査請求 未請求 請求項の数 28 (全94頁)

⑮ 発明の名称 新規ポリペプチド

⑯ 特願 平1-253097

⑰ 出願 平1(1989)9月28日

優先権主張

⑱ 昭63(1988)9月29日 ⑲ 日本 (JP) ⑳ 特願 昭63-245705

㉑ 発明者 佐々木 克敏 東京都町田市旭町3-6-6

㉒ 発明者 西 達也 東京都町田市中町3-9-11

㉓ 発明者 安 村 茂 良 東京都町田市旭町3-6-6

㉔ 発明者 佐 藤 盛 幸 東京都町田市成瀬2730-15

㉕ 発明者 伊 藤 靖 俊 神奈川県相模原市相原6-9-48

㉖ 出願人 協和醣酵工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

最終頁に続く

明細書

1. 発明の名称

新規ポリペプチド

2. 特許請求の範囲

(1) 少なくとも1つの新たな糖鎖の付加が可能なアミノ酸配列を有する新規ポリペプチド。

(2) ポリペプチドに対し、アミノ酸置換、アミノ酸欠失あるいはアミノ酸導入を行うことにより、糖鎖の付加が可能となったものであることを特徴とする請求項1の新規ポリペプチド。

(3) 该アミノ酸配列がN-アセチル化レオニン結合部位(アスパラギン残基-X残基-アスパラギン残基あるいはセリン残基、X残基はプロリン以外のアミノ酸)であることを特徴とする請求項1の新規ポリペプチド。

(4) 請求項1から3のいずれかに記載したポリペプチドに少なくとも1つの糖鎖が付加したグリコシル化ポリペプチド。

(5) 付加した糖鎖が、N-アセチル化レオニン結合部位

N-アセチル化レオニン結合部位、あるいは化学合成した糖鎖であることを特徴とする請求項4記載のグリコシル化ポリペプチド。

(6) 糖鎖の付加部位がポリペプチドにおけるプロテアーゼの切断部位の近傍(その切断部位から8アミノ酸残基以内)にあることを特徴とする請求項1から5のいずれかに記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチド。

(7) 糖鎖の付加部位が、ポリペプチドの表面部位にあることを特徴とする請求項1から5に記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチド。

(8) 請求項1から7のいずれかに記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチドがコロニーリ剤活性因子(顆粒球・マクロファージコロニー剤活性因子、顆粒球コロニー剤活性因子、マクロファージコロニー剤活性因子)、組織プラスミノーゲン活性化因子(以下、t-PAと記す)、ウロキナーゼ(以下、UKと略記する)、インターフェロン- α 、インターフェロン- β 、イ

ンターフェロン- α 、リンホトキシン、リボコルテン、スーパー-オキシドグリズムターゼ、エリスロポイエチンまたはインターロイキン-1、-2、-3、-4、-5、-6または-7であることを特徴とする請求項1から7に記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチド。

(9) 請求項1から7のいずれかに記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチドが、ヒト頸粒球コロニー刺激因子（以下、hG-CSFと略記する）であり、hG-CSFのスレオニン残基（N末端から1番目）がアラニン残基で、ロイシン残基（N末端から3番目）がスレオニン残基で、グリシン残基（N末端から4番目）がチロシン残基で、プロリン残基（N末端から5番目）がアルギニン残基で、システィン残基（N末端から17番目）がセリン残基でそれぞれ置換されていることを特徴とする請求項1から7のいずれかに記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチド。

(10) 請求項9記載のポリペプチドまたはグリコシ

ル化ポリペプチドのアラニン残基（N末端から5番目）がアスパラギン残基で置換されていることを特徴とする請求項9に記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチド。

(11) 請求項9記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチドのグルタミン残基（N末端から145番目）がアスパラギン残基で、アルギニン残基（N末端から147番目）がセリン残基でそれぞれ置換されていることを特徴とする請求項9に記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチド。

(12) 第2表、第3表、および第4表に示したアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を有する請求項9記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチド。

(13) 請求項1から7のいずれかに記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチドがUKであり、該端の付加部位が成熟型UKのトロンビン切断部位の近傍【グリシン残基（N末端から149番目）からフェニールアラニン残基（N

末端から164番目）までの間】に存在することを特徴とする請求項1から7のいずれかに記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチド。

(14) 成熟型UKのフェニールアラニン残基（N末端から164番目）をアスパラギン残基に置換した請求項13記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチド。

(15) 成熟型UKのロイシン残基（N末端から153番目）をアスパラギン残基に置換し、かつプロリン残基（N末端から155番目）をスレオニン残基に置換した請求項13記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチド。

(16) 第6表および第7表に示したアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を有する請求項13記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチド。

(17) 請求項1から16のいずれかに記載のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチドのポリペプチド部分をコードするデオキシリボ核酸

(DNA)。

(18) 請求項17に記載のDNAを組み込んでなる組換え体プラスミド。

(19) プラスミドDNAとして、大腸菌トリプトファンプロモーターあるいはSV40初期プロモーターを有するプラスミドDNAを用い、該DNAが該プラスミドDNAのプロモーターの下流に組み込まれたことを特徴とする請求項18記載の組換え体プラスミド。

(20) pAS28、pASN6、pASN145、pSE1UKS1-1dおよびpSEUKS3から選ばれる請求項18または19に記載の組換え体プラスミド。

(21) 請求項18から20のいずれかに記載の組換え体プラスミドを含有する微生物または動物細胞。

(22) 該微生物が大腸菌に属することを特徴とする請求項21記載の微生物。

(23) 该動物細胞がCHO (Chinese Hamster Ovary)細胞またはナマルバ細胞であることを特

微とする請求項21記載の動物細胞。

(24) 請求項21記載の微生物または動物細胞を培地に培養し、養物中にポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチドを蓄積させ、該培養物から該ポリペプチドまたは該グリコシル化ポリペプチドを採取することを特徴とするポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチドの製造法。

(25) 請求項21記載の微生物または動物細胞を、1-デオキシノグリマイシン、1-デオキシマシンノグリマイシンまたはスワインソニンの糖鎖の生合成あるいはプロセッシングに関する酵素の阻害剤を含有する培地で培養することにより、付加する糖鎖構造を変化させることを特徴とする請求項24記載の製造法。

(26) 该微生物が大腸菌、酵母またはカビに属することを特徴とする請求項24または25記載の製造法。

(27) 该動物細胞がCHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞またはナマルバ細胞であることを特

法に関する。

本発明はすべてのポリペプチドに当てはめることができるものである。本発明によって提供される新たな糖鎖が付加したポリペプチドは、糖鎖の多様な構造が付加されたものであり、天然の蛋白質に比較して物性や活性が優れている。したがって本発明によって提供される糖鎖付加ポリペプチドは、幅広い分野において有用であると期待される。

例えば、本発明のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチドがヒト頭粒球コロニー刺激因子(hG-CSF)である場合、適当な部位に新たな糖鎖が付加したhG-CSFは、プロテアーゼに対する抵抗性が増加する。この新規hG-CSFは、血中におけるタリアンス(除去)が遅くなっていることも十分期待され、医薬品としての利用が期待される。

また、本発明のグリコシル化ポリペプチドがウロキナーゼ(UK)である場合も同様に、新たな糖鎖が適当な部位に付加したUKは、付加しないものより優れた血栓溶解作用を有しており脳血栓、

微とする請求項24または25記載の製造法。

(28) 請求項24から27のいずれかに記載の製造法で採取したグリコシル化ポリペプチドを、シアリダーゼ、B-ガラタクシダーゼ、B-N-アセチルグルコサミニダーゼ、B-マンノシダーゼおよびエンドグリコシダーゼから選ばれるグリコシダーゼまたはシアル酸トランスフェラーゼで処理することにより、付加する糖鎖の構造を変化させることを特徴とするグリコシル化ポリペプチドの製造法。

3.発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、新たな糖鎖の付加が可能なアミノ酸配列を有する新規ポリペプチドおよびそのグリコシル化ポリペプチド、該ポリペプチドまたは該グリコシル化ポリペプチドをコードするデオキシリボ核酸(DNA)、該DNAを含有する組換え体プラスミド、該組換え体プラスミドで形質転換した宿主細胞および形質転換細胞を用いる該ポリペプチドまたは該グリコシル化ポリペプチドの製造

心筋梗塞などの治療薬としての利用が期待される。

従来の技術

大腸菌などの原核生物によって生産される蛋白質が糖鎖を有していないのに対し、酵母、カビ、植物細胞または動物細胞等の真核生物によって生産される蛋白質には糖鎖が結合している場合が多い。

付加する糖鎖は、主として2つの群に大別できる。一つは、蛋白質中のアスパラギン(Asn)残基に結合するN-グリコシド結合型糖鎖で、もう一つは、蛋白質中のセリン(Ser)またはスレオニン(Thr)残基に結合するO-グリコシド結合型糖鎖である。

N-グリコシド結合型糖鎖はN-アセチルグルコサミン2個とマンノース3個の五糖よりなるコア構造を共通の基本構造としており、その糖鎖構造から高マンノース型、複合型、そしてハイブリッド型の3つに分類されている(図1)。これらのアスパラギン結合型糖鎖は、18~20のイソブレンユニットからなるポリイソブレノイドア

ルコールであるドリコールにピロリン酸をはさんでN-アセチルグルコサミン2個、マンノース9個、そしてグルコース3個が結合したリビド中間体 ($\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$) (第2図) を前駆体としている。

リビド中間体が形成される反応経路は“ドリコールリン酸サイクル”としてよく知られている (第3図)。

そして粗面小胞体 (rER) 内腔において生成中のポリペプチド中の Asn-X-Ser/Thr といったアミノ酸配列 (N-グリコシル化部位) 中の Asn 残基に、このリビド中間体の糖鎖部分がひとまとめに転移され、N-グリコシド結合を形成する。この場合Xはプロリン (Pro) 以外のどんなアミノ酸でもよく、またこの反応は、脳膜器の1種である“オリゴ糖転移酵素 (Oligosaccharyl transferase)”によって触媒されることが知られている。この後、rERおよびゴルジ体を通過する過程で糖鎖はトリミングとプロセッシングを受け、高マンノース型、ハイブリッド型あ

るいは複合型として完成される (第4図)。トリミングとプロセッシングの過程においては多くのグリコシダーゼとグリコシルトランスフェラーゼが関与していることが知られている。

高マンノース型は、動植物起源および酵母、カビの糖蛋白質においてしばしば見られるのに対し、複合型糖鎖は動物起源に限定されていると推定されている。

N-グリコシド結合型糖鎖は上述したようにポリペプチド中の Asn-X-Ser/Thr (XはPro以外のアミノ酸) 中の Asn 残基に結合するが多くの蛋白質中には非糖鎖結合の Asn-X-Ser/Thr 配列が存在しており、この配列が存在すれば必ず糖鎖が付加するというものではない。事実ウイリアム・ジェイ・レナルツ (William J. Lennarz) らは、蛋白質の立体構造が糖鎖の結合を促す上で重要なことを示唆している。それは、 Asn-X-Ser/Thr の配列を持った単純なトリペプチドや、天然の蛋白質のように複雑に折りたたまれた空間構造をもたな

い変性蛋白質がインビトロ (in vitro) で酵素的に、比較的容易に糖鎖を結合させるという知見に基づいている。

一方、O-グリコシド結合型糖鎖においては、ポリペプチド中の Ser または Thr 残基にN-アセチルガラタトサミンを介して結合し、それにガラクトース、シアル酸、フコース、末端N-アセチルガラタトサミンが結合しているのが普通である [鈴木 旺ら: 蛋白質、核酸、酵素、30, 513 (1985)]。また上述のN-グリコシド結合型糖鎖の場合と異なり、その合成にrERは関与せず、すべてゴルジ体で行われると考えられている [ジョンソン (Johnson) ら: セル (Cell), 32, 987 (1983)]。また、N-グリコシド結合型の場合とは異なり糖鎖付加におけるアミノ酸配列上の規則性も存在していない。しかしながらPro-Thr/Ser、Thr/Ser-Pro、Thr/Ser-X₁₋₃-ProなどのようにProが近くに存在した場合に糖鎖が付加しやすい傾向にあることが知られている。この場合、Xはどんなアミノ酸でもよい [高橋ら: プロシーダ

ィング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.), USA, 81, 2021 (1984)]。

糖蛋白質の糖鎖の本質的な生物学的機能については、未知の部分も多いが、多くの糖蛋白質に関する研究により、今までに糖鎖の多様な機能が明らかにされてきている。

まず、糖鎖は蛋白質を安定化することが知られている。血中におけるタリアラントスの運送もその1例である。大腸癌に遺伝子移入してつくられたヒトエリスロポイエチン (アスパラギン結合型糖鎖を欠く)、あるいは、糖鎖を酵素処理で除去したヒトエリスロポイエチン (複数する) は、in vitro では活性を示すが、インビトロ (in vivo) では急速にタリアラントスされ、活性が低いことが知られている [ヨーダル (Dordal) ら: エンドocrinology, 116, 2293 (1985) およびブローネ (Brown) ら: コールド・スプリング・ハーバー・シンポジア・オン・クオンティティティ・アンド・バイオロジー (Cold Spr. Harb. Symp. Quant.

Biol.), 51, 693 (1986)]。またヒト顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (hGM-CSF) は、天然ではN-アセチルコシド結合型糖鎖を2本持っているが、糖鎖の本数を減らすとそれに比例してラット血漿からのクリアランス速度が速まることが知られている [オナヒュー (Onahue) ら: コールド・スプリング・ハーバー・シンポジア・オン・タオントティティエイティプ・バイオロジー (Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.), 51, 685 (1986)]。クリアランスの速度およびクリアランスされる部位は糖鎖の構造によっても変化し、シアル酸がついたhGM-CSFは腎臓でクリアランスされるのに対し、シアル酸を除去したhGM-CSFはクリアランス速度が速まり、肝臓でクリアランスされことが知られている。また、ラット肝初代培養の系で各種のアスパラギン結合型糖鎖生合成阻害剤存在下に生合成された、糖鎖構造の異なる α -acid glycoproteinについて、ラットの血漿からのクリアランス速度およびラット腎滤液からのクリアランス速度を調べたところ、どちらの場

合も、高マノース型>糖鎖欠損型>ハイブリッド型>複合型 (天然型) の順であった [グロス (Gross) ら: ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Eur. J. Biochem.), 162, 83 (1987)]。安定化の別の例として、糖鎖がプロテアーゼ抵抗性を付与していることが知られている。例えば、フィブロネクチン (fibronectin) の糖鎖形成をソニカマイシンで阻害すると、得られた糖鎖欠損フィブロネクチンの細胞内蛋白質の分解の速度が増進する [オルデン (Olden) ら: セル (Cell), 13, 461 (1987)]。糖鎖の付加により、熱安定性や抗原性が増大することも知られている。また、エリスロボイエチンやヨーインターフェロンなどにおいては、蛋白質の溶解性の増大に糖鎖が寄与していることが知られている。

糖鎖は、蛋白質が正しい立体構造を保持するのにも役立っている。水泡性口内炎ウイルスの脱結合蛋白質の天然に存在する2本のN-アセチルコシド結合型糖鎖を除去すると、蛋白質の細胞表面への輸送が阻害されるが、その蛋白質に新たな糖鎖

が付加されるとそれが回復することが知られている。この場合、糖鎖の除去により、ジスルフィド結合による蛋白質分子間の会合が誘起され、その結果蛋白質輸送が阻害されることが明らかとなつた。また新しく付加した糖鎖は、この会合を阻害することにより蛋白質の正しい立体構造を保持することができ再び蛋白質輸送が可能になったと考えられている。また、その際新たな糖鎖を付加する位置については、かなりの融通性があることが示されている。またその反面、導入する位置によっては天然の糖鎖を有する蛋白質の輸送をも完全に阻害する場合があることも明らかとなつた [ローズ (Rose) ら: ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 263, 5948 および 5955 (1988)]。

糖鎖がポリペプチド上の抗原部位をマスクしている例も知られている。hGM-CSF、プロラクチン、インターフェロン- γ 、ラクシマー

(Rauscher) 白血病ウイルス gp70およびインフルエンザヘマグルチニンにおいて、ポリクローナル

抗体またはペプチド上の特定の領域に対するモノクローナル抗体を用いた実験から、これら蛋白質の糖鎖が、抗体との反応を阻害しているという結論が引き出された。しかし、この反面、ある種の蛋白質においては逆に免疫反応を誘発する場合も知られており、糖鎖が二重の役割を演することが示唆されている。

糖鎖自身が蛋白質の活性発現に直接係わっている場合もあることが知られている。例えば、興味深いホルモン、糖脂質ホルモン、糖蛋白質ホルモンのような糖蛋白質ホルモンがそれである。

最後に、糖鎖の重要な機能として、認識現象への関与ということが上げられる。糖鎖が、細胞間、蛋白質間あるいは細胞と蛋白質間の認識現象に関与していると考えられる多くの例が知られており、糖鎖の構造の違いにより生体内クリアランスの場所が異なることもその1例である。

以上糖蛋白質の糖鎖の構造と機能について述べてきた。糖鎖の構造と機能の解析の手段について

は現在著しく進展しており、ペプチド骨格に結合した糖鎖の物理化学的性質についていろいろな解析が可能となってきた。

とくに糖鎖を逐次解離していく特異性の高い酵素（エキシングリコシダーゼ）やペプチド鎖との結合点をペプチド鎖と糖鎖の双方を傷めずに開裂するグリコペプチダーゼやエンド型グリコシターゼが実用になったことによって、糖鎖の生物学的な役割についても詳細な研究ができるようになったことは特筆すべきことであろう。また、グリコシルトランスフェラーゼにより、新たな糖鎖を付加することも可能である。例えば、シアル酸トランスフェラーゼにより、糖鎖の末端にシアル酸を新たに付加することもできる。その他種々のグリコシルトランスフェラーゼやグリコシダーゼの阻害剤を用いることにより、付加する糖鎖を変化させる技術もよく知られている。

先に述べた水泡性口内炎ウイルスの膜結合糖蛋白質のように、糖鎖を付加する技法が糖鎖の機能を研究する目的に用いられた例はあるが、産業上

ペプチドのかかる性質を改善することは重要な課題である。

問題点を解決するための手段

本発明では、かかる課題を解決するために、生理活性ポリペプチドに新たな糖鎖を付与する方法を開発した。その方法は、プロテアーゼ切断部位近傍などの所望の部位に新たな糖鎖の付加が可能となるように、ポリペプチドのアミノ酸配列を変化させ、その変異ポリペプチドをコードするDNAを組換えDNA技術により構築し、組換え発現ベクターに組込んだものを微生物または動物細胞に導入し、発現させることを利用した方法である。このような方法によって得られたグリコシル化ポリペプチドの性質を調べたところ、プロテアーゼ抵抗性などのすぐれた性質が付与されていることを見い出し、本発明を完成するに至った。

発明の具体的説明

本発明によれば、少なくとも1つの糖鎖の付加が可能なアミノ酸配列を有する新規ポリペプチドおよびそのグリコシル化ポリペプチド、該ポリペ

利用価値の高いポリペプチドの改良に用いられた例はまだない。一般に、生理活性ポリペプチドは、プロテアーゼ切断による活性低下、熱処理による活性低下、あるいは生体内に投与したときにクリアランスを受けやすいことなどの好ましくない性質を有する場合が多い。これまでに、このようなポリペプチドのアミノ酸配列を改変し、新たな糖鎖を意図的に付加することにより、プロテアーゼ抵抗性、熱安定性、あるいは血中安定性などを増加させたという例は知られていない。本発明において意図的に新たな糖鎖を付加することにより、上記ポリペプチドの諸性質を改善する手法を開発した。

発明が解決しようとする問題点

生理活性ポリペプチドは、一般に、プロテアーゼ切断による活性低下、熱処理による活性低下、生体内に投与したときにクリアランスを受けやすいなど、不利な性質を有している場合が多い。たとえば、UKはトロンビンというプロテアーゼによって不活性型になってしまう。生理活性ポリペ

チドまたは該グリコシル化ポリペプチドをコードするDNA、該DNAを含有する組換え体プラスミド、該組換え体プラスミドを含む微生物または動物細胞、および該微生物または動物細胞を用いる該ポリペプチドまたは該グリコシル化ポリペプチドの製造法が提供される。

本発明の目的は、任意のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチドに少なくとも一つの新たな糖鎖を付加することにより、前記した糖鎖の持つ機能のいずれかを、ポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチドに新たに付与しようとするものである。例えば本発明は新たな糖鎖を付加することによりポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチドを安定化して血中でのクリアランスを延長させ、また、そのポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチドを生体内の特定の場所に指向させることを目的とするものである。またプロテアーゼによるポリペプチドの切断が生物学的活性に大きく関与している場合においては、糖鎖を付加することによりプロテアーゼ抵抗性を増加させ、

生物学的活性を制御することができる。

新たな糖鎖の付加が可能なアミノ酸配列をポリペプチド中に作成するためには、ポリペプチドのアミノ酸置換、アミノ酸欠失、アミノ酸挿入などの方法によって行うことができる。

たとえばN-アセチルグルコサミド結合型糖鎖を結合させるためのアミノ酸としては、アスパラギン (Asn) が、O-アセチルグルコサミド結合型糖鎖を結合させるためのアミノ酸としては、セリン (Ser)、スレオニン (Thr) が知られているので、これらのアミノ酸がポリペプチド上の好適な位置に存在するようにすればよい。

好適には、Asn-X-Thr/Ser (Xはプロリン以外のアミノ酸) で示されるトリペプチドを、対象とするポリペプチドの適当な部位に導入することによって糖鎖の付加が可能なアミノ酸を該ポリペプチド中に存在させることができる。このトリペプチドの導入は遺伝子の部位特異的変異の方法に従って行うことができる。

新たな糖鎖を付加するにあたって重要なのは、

糖鎖を付加する位置である。前述のように、ポリペプチド上の位置によっては糖鎖が付加しない場合があるし、また新たな糖鎖が付加されても、その結果ポリペプチドの正しい立体構造が破壊され、医薬品が阻害されたり、活性を消失する場合もある。したがって、新たな糖鎖を付加する位置は少なくともポリペプチドの表面部位にある必要がある。立体構造が既にわかっているポリペプチドにおいては、その表面部位があきらかなので、容易に付加部位を決定することができる。また、糖鎖付加による活性低下を最小限におさえるためには、活性部位から立体構造上できるだけ離れている方が望ましい。そこで、立体構造に加え活性部位も明らかなポリペプチドにおいては上記のことを考慮して付加部位を決定できる。一方、ポリペプチドの立体構造が未知の場合には、ポリペプチドの一次構造よりその親水性 (Hydropathy) を計算し、表面部位を推定することができる。また、一次構造からチヨーファスマン (Chou-Fasman) [バイオケミストリー (Biochemistry) 13, 211 (1974)].

バイオケミストリー (Biochemistry) 13, 222 (1974), アドバインスト・エンザイモロジー (Adv. Enzymol.) 47, 45 (1978)] の方法、あるいはロブソン (Robson) [ジャーナル・オブ・モレキュラーバイオロジー (J. Mol. Biol.) 107, 327 (1976), 同 120, 97 (1978)] の方法で 2 次構造を予想することで、ターン構造を形成しそうな場所を推定することもできる。また、各種プロテアーゼで処理して、切断されやすい部位を同定することにより、表面部位に関してさらに詳しい情報を得ることができる。プロテアーゼ切断部位近傍は、ポリペプチドの表面に位置している可能性が高いと考えられるため、ポリペプチドに効率よく糖鎖を付加しようとする際や、天然の蛋白質と同等の活性を有する糖鎖付加ポリペプチドを取得しようとする際には、糖鎖付加の絶好の標的部位となる。また、プロテアーゼ切断部位近傍に糖鎖が付加されたポリペプチドは、そのプロテアーゼに対して抵抗性になることが期待され、その安定化を図るという意味においても、プロテアーゼ切断部位近傍は糖

鎖の付加部位として非常に適しているといえる。好適にはポリペプチドのプロテアーゼ切断部位から 8 アミノ酸残基以内に糖鎖付加部位を導入することが望ましい。

また、立体構造が既知の場合も未知の場合も、上記のようにして選択した部位のいくつかに実際に糖鎖付加部位を導入し、そこに実際に糖鎖が付加するかどうかを確認する必要がある。また、糖鎖が付加されたポリペプチドについては、それが生物学的活性を保持しているか、活性の低下はないか、すぐれた機能が付加されているか、などについて評価する必要がある。

本発明の対象とするポリペプチドとしては、生理活性を有するものであればいずれでもよいが、好適には、コロニー刺激因子 (颗粒球・マクロファージコロニー刺激因子、颗粒球コロニー刺激因子、マクロファージコロニー刺激因子)、組織プラスミノーゲン活性化因子 (t-PA)、ウロキナーゼ (u-PA)、インターフェロン- α 、インターフェロン- β 、インターフェロン- γ 、リンホ

トキシン、リボコルテン、スーパーオキシドグスマターゼ、エリスロボイエチン、インターロイキン-1、-2、-3、-4、-5、-6または-7などがあげられる。

ポリペプチドに糖鎖を付加する方法は以下のとおりである。まず、プロテアーゼ切断部位近傍などの所望の部位のアミノ酸配列を新たな糖鎖の付加が可能となるように改変した変異ポリペプチドをコードするDNAを組換えDNA技術により構築する。次に、そのDNAを発現ベクターに組み込んだものを微生物（酵母やカビなど）または動物細胞（CHO細胞やナマルバ細胞など）に導入し、発現させることにより、新たな糖鎖の付加したポリペプチドを得ることができる。N-アセチルグルコサミド結合型糖鎖を付加しようとする際には、糖鎖付加部位にN-アセチルグルコサミド結合部位（Asn-X-Ser/Thr; XはPro以外の任意のアミノ酸）が生じるよう改変すればよい。変異ポリペプチドをコードするDNAの構造は、部位特異的変異や合成DNAリンクを用いて行うこと

ペプチドがhG-CSF、UKおよびt-PAである場合についてさらに具体的に説明する。

(1) 本発明のポリペプチドまたはグリコシル化ポリペプチドがhG-CSFである場合：

組換えDNA技術を用いて大腸菌で生産し、精製したhG-CSFおよびhG-CSF酵母体hG-CSF [ND28]（参考例18参照）を用いての解析からhG-CSFの成熟ポリペプチドのN末端より144番目のフェニルアラニン（Phe）残基の後が、キモトリプシンによって分解されやすいことが明らかとなった。またhG-CSF [ND28]に関しては、N末端の4~7アミノ酸残基が種々のプロテアーゼ（ズブチリシン、キモトリプシン、トリプシンなど）によって切断されやすくなっていることも判明した。なおhG-CSF [ND28]は、大腸菌で生産、精製した成熟hG-CSFに比べて、活性が上昇していることが知られている。上述したような知見から、hG-CSF [ND28]のN末端に近い部分およびN末端より144番目付近がポリペプチドの

ができる。

また、糖鎖の構造はその構造に大きく依存している。したがって、付加する糖鎖の構造を変化させ、より優れた性質を付加する糖鎖を選択することも重要なことであり、本発明はこうした最適化の過程をも含むものである。糖鎖の構造を変化させる方法としては以下に示すようなものがある。

1) 蛋白質を生産させる宿主を変える。2) 上記の組み換え体プラスミドを含有する微生物または動物細胞を、1-デオキシノグリマイン、1-デオキシマシンノグリマイン、スワインソニンなどの糖鎖の生合成あるいはプロセッシングに係わる酵素の阻害剤を含有する培地で培養する。3) 糖鎖付加タンパクを、シアリダーゼ、β-ガラクトシダーゼ、β-N-アセチルグルコサミニダーゼ、β-マンノシダーゼ、エンドグリコシダーゼ等の各種グリコシダーゼや、シアル酸トランスフェラーゼ等のグリコシルトランスフェラーゼで処理する。

本発明のポリペプチドまたはグリコシル化ポリ

表面に存在していることが推定される。そこでhG-CSF [ND28]のN末端より6番目あるいは145番目のアミノ酸残基に糖鎖を付加することを試みた。hG-CSF [ND28]のN末端より6番目のアミノ酸残基に糖鎖付加部位を持つ酵母体がhG-CSF [ND28N6]でありN末端より145番目のアミノ酸残基に糖鎖付加部位を持つ酵母体がhG-CSF [ND28N145]である。この場合、糖鎖の付加によりプロテアーゼ抵抗性の獲得が期待される。またポリペプチドの安定化により、血中でのクリアランスが遅くなることも期待される。

本発明で用いたhG-CSF、hG-CSF [ND28]、hG-CSF [ND28N6]およびhG-CSF [ND28N145]のアミノ酸配列は、それぞれ第1表、第2表、第3表および第4表に示した。

第 1 表

10 20 30 40 50 60
 ACCCCCCCTGGGCCCCCTGCCA6CTCCCCCTGCCA6CTGGCTCCAGAGCTTCCTGCTCAAGTGCTTAGAGCAA
 ThrProLeuGlyProAlaSerSerLeuProGlnSerPheLeuLeuLysCysLeuGluGln
 70 80 90 100 110 120
 GTGAGGAAGATCCAGGGCGATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAAGCTGTGTGCCACCTACAAG
 ValArgLysIleGlnGlyAspGlyAlaAlaLeuGlnGluLysLeuCysAlaThrTyrLys
 130 140 150 160 170 180
 CTGTGCCACCCCGA66AGCTGGT6CTGCTCGGACACTCTCTGGCATCCCCCTGGCTCCC
 LeuCysHisProGluGluLeuValLeuLeuGlyHisSerLeuGlyIleProTrpAlaPro
 190 200 210 220 230 240
 CTGAGCAGCTGCCCA66CCAGGCCCTGCAGCTGGCAGGCTGCTTGAGCCAACCTCCATAGC
 LeuSerSerCysProSerGlnAlaLeuGlnLeuAlaGlyCysLeuSerGlnLeuHisSer
 250 260 270 280 290 300
 GGCCTTTCTCTACCA66GGCTCTGCCA66CCCTGGAGA66GATCTCCCCCGAGTTGGGT
 GlyLeuPheLeuTyrGlnGlyLeuLeuGlnAlaLeuGluGlyIleSerProGluLeuGly
 310 320 330 340 350 360
 CCCACCTGGACACACTGCAGCTGGACGCTGCCGACTTGGCACCCACCATCTGGCAGCAG
 ProThrLeuAspThrLeuGlnLeuAspValAlaAspPheAlaThrThrIleTrpGlnGln
 370 380 390 400 410 420
 ATGGAAGAACTGGGAATGGGCTCTGCCCTGCAGCCCAGGGTGCCATGCCGGCCTTC
 MetGluGluLeuGlyMetAlaProAlaLeuGlnProThrGlnGlyAlaMetProAlaPhe
 430 440 450 460 470 480
 GGCCTCTTTCCAGCGGGCAGGAGGGGCTCTAGTTGCCCTCCCATCTGCAGAGCTTC
 AlaSerAlaPheGlnArgArgAlaGlyGlyValLeuValAlaSerHisLeuGlnSerPhe
 490 500 510 520
 CTGGAGGTGTCGTACCGCGTTCTACGCCACCTTGCCCAGGCCCTGA
 LeuGluValSerTyrArgValLeuArgHisLeuAlaGlnPro***

第 2 表

10 20 30 40 50 60
 GCAACACATATGCCCTCGAGCTCACACAGAGCTTCTTTAAAAAGCTTAGAGCAA
 AlaProThrTyrArgAlaSerSerLeuProGlnSerPheLeuLeuLysSerLeuGluGln
 70 80 90 100 110 120
 GTGAGGAAGATCCAGGGCGATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAAGCTGTGTGCCACCTACAAG
 ValArgLysIleGlnGlyAspGlyAlaAlaLeuGlnGluLysLeuCysAlaThrTyrLys
 130 140 150 160 170 180
 CTGTGCCACCCCGAGGGCTGGT6CTGCTGCCA66GACACTCTCTGGCATCCCCCTGGCTCCC
 LeuCysHisProGluGluLeuValLeuLeuGlyHisSerLeuGlyIleProTrpAlaPro
 190 200 210 220 230 240
 CTGAGCAGCTGCCAGGCCCTGCAGCTGGCAGGCTGCTTGAGCCAACCTCCATAGC
 LeuSerSerCysProSerGlnAlaLeuGlnLeuAlaGlyCysLeuSerGlnLeuHisSer
 250 260 270 280 290 300
 GGCCTTTCTCTACCA66GGCTCTGCCA66CCCTGGAGGAGGATCTCCCCCGAGTTGGGT
 GlyLeuPheLeuTyrGlnGlyLeuLeuGlnAlaLeuGluGlyIleSerProGluLeuGly
 310 320 330 340 350 360
 CCCACCTGGACACACTGCAGCTGGACGCTGCCGACTTGGCACCCACCATCTGGCAGCAG
 ProThrLeuAspThrLeuGlnLeuAspValAlaAspPheAlaThrThrIleTrpGlnGln
 370 380 390 400 410 420
 ATGGAAGAACTGGGAATGGGCTCTGCCCTGCAGCCCACCCAGGGTGCCATGCCGGCCTTC
 MetGluGluLeuGlyMetAlaProAlaLeuGlnProThrGlnGlyAlaMetProAlaPhe
 430 440 450 460 470 480
 GGCCTCTTTCCAGCGCC666CA666G666CTCTAGTTGCCCTCCCATCTGCAGAGCTTC
 AlaSerAlaPheGlnArgArgAlaGlyValLeuValAlaSerHisLeuGlnSerPhe
 490 500 510 520
 CTGGAGGTGTCGTACCGCGTTCTACGCCACCTTGCCCAGGCCCTGA
 LeuGluValSerTyrArgValLeuArgHisLeuAlaGlnPro***

第3表

10 20 30 40 50 60
 GCACCTACGTATCGCAACTCGAGTCTACCACAGAGCTTCTTTAAAAAGCTTAGAGCAA
AlaProThrTyrArgAsnSerSerLeuProGlnSerPheLeuLysSerLeuGluGln
 70 80 90 100 110 120
 GTGAGGAAGATCCAGGCGATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAAAGCTGTBTGCCACCTACAAAG
 ValArgLysIleGlnGlyAspGlyAlaAlaLeuGlnGluLysLeuCysAlaThrTyrLys
 130 140 150 160 170 180
 CTGTCGCCACCCCGAGGAGCTGGTCTGCTCGGACACTCTCTGGCATCCCCCTGGCTCCC
 LeuCysHisProGluGluLeuValLeuLeuGlyHisSerLeuGlyIleProTrpAlaPro
 190 200 210 220 230 240
 CTGAGCAAGCTGCCAACCGAGGCCCTGCAGCTGGCAGGCTGGCTGAGCCAACCTCCATAGC
 LeuSerSerCysProSerGlnAlaLeuGlnLeuAlaGlyCysLeuSerGlnLeuHisSer
 250 260 270 280 290 300
 GGCCTTCTCTACCAAGGGCTCTGCAGGCCCTGGAAAGGATCTCCCCCGA6TTGGGT
 GlyLeuPheLeuTyrGlnGlyLeuLeuGlnAlaLeuGluGlyIleSerProGluLeuGly
 310 320 330 340 350 360
 CCCACCTGGACACACTGCAGCTGGACGTCGCCGACTTGGCCACCACATCTGGCAGCAG
 ProThrLeuAspThrLeuGlnLeuAspValAlaAspPheAlaThrThrIleTrpGlnGln
 370 380 390 400 410 420
 ATGGAAAGAACTGGAAATGGCCCTGCGCTGCAAGCCACCCAGGGTGCCTGCGCATGCCGGCCTTC
 MetGluGluLeuGlyMetAlaProAlaLeuGlnProThrGlnGlyAlaMetProAlaPhe
 430 440 450 460 470 480
 GGCCTCTGCTTCCAGCAGGGCGAGGAAGGGCTCTAGTTGCCCTCCATCTGCAGAGCTTC
 AlaSerAlaPheGlnArgArgAlaGlyGlyValLeuValAlaSerHisLeuGlnSerPhe
 490 500 510 520
 CTGGAGGTGTCGTACCGCGTTCTACGCCACCTTGCCCAGGCCCTGA
 LeuGluValSerTyrArgValLeuArgHisLeuAlaGlnPro***

第4表

10 20 30 40 50 60
 GCACCAACATATCGCCTCGAGTCTACCACAGAGCTTCTTTAAAAAGCTTAGAGCAA
AlaProThrTyrArgAlaSerSerLeuProGlnSerPheLeuLysSerLeuGluGln
 70 80 90 100 110 120
 GTGAGGAAGATCCAGGCGATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAAAGCTGTGTGCCACCTACAAAG
 ValArgLysIleGlnGlyAspGlyAlaAlaLeuGlnGluLysLeuCysAlaThrTyrLys
 130 140 150 160 170 180
 CTGTCGCCACCCCGAGGAGCTGGTCTGCTCGGACACTCTCTGGCATCCCCCTGGCTCCC
 LeuCysHisProGluGluLeuValLeuLeuGlyHisSerLeuGlyIleProTrpAlaPro
 190 200 210 220 230 240
 CTGAGCAGCTGCCAACCGAGGCCCTGCAGCTGGCAAGGCTGGTGGAGCCAACCTCCATAGC
 LeuSerSerCysProSerGlnAlaLeuGlnLeuAlaGlyCysLeuSerGlnLeuHisSer
 250 260 270 280 290 300
 GGCCTTCTCTACCAAGGGCTCTGCAGGCCCTGGAAAGGATCTCCCCCGA6TTGGGT
 GlyLeuPheLeuTyrGlnGlyLeuLeuGlnAlaLeuGluGlyIleSerProGluLeuGly
 310 320 330 340 350 360
 CCCACCTGGACACACTGCAGCTGGACGTCGCCGACTTGGCCACCACATCTGGCAGCAG
 ProThrLeuAspThrLeuGlnLeuAspValAlaAspPheAlaThrThrIleTrpGlnGln
 370 380 390 400 410 420
 ATGGAAAGAACTGGAAATGGCCCTGCGCTGCAAGCCACCCAGGGTGCCTGCGCATGCCGGCCTTC
 MetGluGluLeuGlyMetAlaProAlaLeuGlnProThrGlnGlyAlaMetProAlaPhe
 430 440 450 460 470 480
 GGCCTCTGCTTCAATCGATGGCAGGAGGGGCTCTAGTTGCCCTCCATCTGCAGAGCTTC
 AlaSerAlaPheAsnArgSerAlaGlyGlyValLeuValAlaSerHisLeuGlnSerPhe
 490 500 510 520
 CTGGAGGTGTCGTACCGCGTTCTACGCCACCTTGCCCAGGCCCTGA
 LeuGluValSerTyrArgValLeuArgHisLeuAlaGlnPro***

本発明では、hG-CSF、hG-CSF [ND28]、hG-CSF [ND28N6] および hG-CSF [ND28N145] をそれぞれコードする DNA を組換え DNA 技法により複数種、組換え発現ベクターに組込んだものを動物細胞に導入し、発現させることにより、hG-CSF、hG-CSF [ND28]、hG-CSF [ND28N6] および hG-CSF [ND28N145] を生産することができる。このようにして得られるポリペプチドのうち hG-CSF [ND28N6] および hG-CSF [ND28N145] においては、生産される全 hG-CSF の約 1/3 に新たな糖鎖 (N-グリコシド結合型糖鎖) が付加している。また hG-CSF [ND28N6] および hG-CSF [ND28N145] について、新たな糖鎖の付加したものと付加しなかったものとのプロテアーゼ感受性を比較したところ、新たな糖鎖の付加したものの方がプロテアーゼ抵抗性になっていることが判明した。また、hG-CSF [ND28N6] においては、新たな糖鎖の付加

したものは、それを酵素的に除去したものに比べて熱に対して安定であることも判明し、本発明の有効性が示された。なお、動物細胞で発現させた hG-CSF [ND28] には新たにローグリコシド結合が付加することも明らかとなっている。この場合も新たな糖鎖の付加したものの方がプロテアーゼ抵抗性になっている。

② 本発明のポリペプチドあるいはグリコシル化ポリペプチドが UK あるいは t-PA である場合：

現在使用されている血栓溶解剤としてはウロキナーゼ (UK) およびストレプトキナーゼ (SK) があるが、これらの血栓溶解剤は血栓成分のフィブリンに対する親和性を有していない。そのため、血栓を溶解させるには多量投与が必要であり、また血栓に吸着したプラスミノーゲンだけでなく血中のプラスミノーゲンも活性化することにより、全身凝溶の亢進が起こり、出血傾向が現れる。これらの血栓溶解剤に対し、フィブリン親和性を有する組織プラスミノーゲン活性化因子 (t-PA) と UK の不活性型前駆体であるプロウロキナーゼ

(pro-UK) が最近注目を集めている。

t-PA はフィブリン親和性を有するために、血栓に特異的に吸着し、效率よく血栓を溶解すると同時に、全身の凝溶亢進も出現しないことが期待される。t-PA には 1 本鎖型と 2 本鎖型が存在し、プラスミンにより 1 本鎖型は 2 本鎖型に変換される。2 本鎖 t-PA が活性型であるが、1 本鎖 t-PA もフィブリン分解物が存在すると、2 本鎖 t-PA と同等のフィブリン溶解活性を示す。1 本鎖 t-PA と 2 本鎖 t-PA のフィブリン親和性を比較した場合、1 本鎖 t-PA の方がフィブリン親和性が強いことが明らかにされている〔テイト (Tate) ら: バイオケミストリー (Biochemistry) 26, 338 (1987)〕。したがって、1 本鎖 t-PA の方が血栓に対する特異性が高く、2 本鎖 t-PA より優れているといえる。

一方、UK にも 1 本鎖型と 2 本鎖型が存在し、プラスミンにより不活性な 1 本鎖 UK から活性型の 2 本鎖 UK に変換される。この不活性な 1 本鎖 UK は pro-UK とも呼ばれる。この不活性な

1 本鎖 UK、すなわち pro-UK はトロンビンというプロテアーゼが存在すると、活性を失った 2 本鎖型の UK に変換されてしまう〔イチノセ (Ichinose) ら: ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) 261, 3488 (1986)〕〔グアビィチ (Gurewich) とパネル (Pannell) : ブラット (Blood) 69, 789 (1987)〕。このトロンビンに対する感受性は pro-UK にとって不利な性質である。

上述のように、血栓溶解酵素である t-PA および pro-UK は、プラスミンやトロンビンなどのプロテアーゼの作用により不利な型に変換してしまう。そこで、本発明においてのべた方法を用いてこれらのプロテアーゼ切断部位の近傍に糖鎖を付加し、これらのプロテアーゼに対する感受性を低くすることができれば、より優れた血栓溶解酵素になることが期待できる。このような観点から、成熟型 pro-UK の 184 日の Phe 残基を Asn 残基に変換し、この Asn 残基に N-グリコシド結合型糖鎖を導入した誘導体 UK -

S1をコードするDNAならびに成熟型pro-UKの153番目のLeu残基をAsn残基に置換し、かつ155番目のPro残基をThr残基に置換し、このAsn残基にN-アグリコシド結合型糖鎖を導入した前導体UK-S3をコードするDNAを構築した。

なお、本発明で用いた天然型 pro-UK, UK-S1 および UK-S3 のアミノ酸配列は、それぞれ第5表、第6表および第7表に示した。

四

本発明では、*pro-UK*、*UK-S1*および*UK-S3*をそれぞれコードするDNAを組換えDNA技術により構築し、組換え発現ベクターに組み込んだものを動物細胞に導入し、発現させることにより、*pro-UK*ならびに新たな構造が付加された*UK-S1*および*UK-S3*を製造する。このようにして得られた*pro-UK*、*UK-S1*および*UK-S3*の性質を比較したところ、*UK-S1*および*UK-S3*は天然型*pro-UK*に比べ、トロンビンに対する感受性が低くなっていることならびに血中安定性、熱安定性が向上していることが判明し、本発明の有効性が*UK*の場合においても示されている。

本発明のポリペプチドあるいはグリコシル化ポリペプチドが*hG-CSF*、*UK*あるいは*t-PA*である場合、*hG-CSF*、*UK*あるいは*t-PA*をコードするDNAとしては、*hG-CSF*、*UK*あるいは*t-PA*をコードするメッセージ RNAから組換えDNA技術で逆転写して得られるcDNA、染色体DNAから得られる*hG-*

とができるが、具体的にはプラスミド*p t PA7*中のヒト*t-PA*cDNAあるいはプラスミド*p UK1*あるいは*p UK11*の中のヒト*UK*cDNAを用いることができる。*p t PA7*、*p UK1*、*p UK11*は、本発明者によって製造されたものであり、その製造法は参考例1、2、3に記載されている。*p UK1*と*p UK11*中のヒト*UK*cDNAは*M13*ファージを用いたディオキシ・シーケンス(dideoxy sequence)法により決定した。

*p UK1*と*p UK11*中のヒト*UK*cDNAはともに完全な*pro-UK*をコードしていないが、それらのcDNAの塩基配列は第5表に示す塩基配列の一部と一致している。

なお、*p t PA7*を含む大腸菌は*Escherichia coli* *EtPAT*(PBRM BP-1467)として、*p UK1*を含む大腸菌は*Escherichia coli* *UK1* (PBRM BP-1463)として、および*p UK11*を含む大腸菌は*Escherichia coli* *UK11*(PBRM BP-1464)として、工業技術院微生物工業技術研究所(微工研)に昭

CSF、*UK*あるいは*t-PA*をコードするDNA、*hG-CSF*、*UK*あるいは*t-PA*をコードする合成DNAなどが利用できる。

*hG-CSF*cDNAとしては、*hG-CSF*をコードしているものであればいかなるものも用いられることができるが、具体的には*pCSF2*を用いることができる。*pCSF2*は、本発明者によって製造されたものであり、その製造法は参考例4に記載されている。

*pCSF2*中の*hG-CSF*cDNAは、*M13*ファージを用いたディオキシ・シーケンス(dideoxy sequence)法(ジェイ・ヘッシング(J. Hessing)ら:ジーン(Gene) 19, 269 (1982))により決定された。*pCSF2*中の*hG-CSF*cDNAはシグナル配列の一部を欠いているが成熟蛋白質部分は完全に含んでいる。成熟蛋白質部分の塩基配列を第1表に示す。

ヒト*t-PA*cDNAあるいはヒト*UK*cDNAとしては、ヒト*t-PA*あるいはヒト*UK*をコードしているものであればいかなるものも用いるこ

とができるが、具体的には1982年9月3日付で寄託されている。

hG-CSF、*UK*あるいは*t-PA*をコードするDNAを組込むプラスミドとしては、大腸菌または動物細胞で該DNAが発現できるものなら、いかなるプラスミドも用いることができる。好ましくは、大腸菌内での*hG-CSF*、*UK*、あるいは*t-PA*を発現させるには、適当なプロモーター、例えば、*t t P*系、*Lac*系のプロモーターの下流に外来DNAを挿入することができ、しかもシャインダルガーノ配列(以下SD配列と略記する)と開始コドン(ATG)の間を適当な距離、例えば6~18塩基に調整したプラスミドを用いることができる。具体的に好適なプラスミドとしては、本発明者によって造成された*p KY P10*(特開昭58-110800)、*p T t S 33*(参考例5)などがあげられる。

また、*hG-CSF*、*UK*、あるいは*t-PA*をコードするDNAを動物細胞で発現させる際に用いるプラスミドとしては、動物細胞で該DNAを発現できるものならいかなるプラスミドも用い

ことができる。好ましくは、適当なプロモーター、例えばSV40初期プロモーター、SV40後期プロモーターなどの下後に外来DNAを挿入することができ、しかも、ポリAシグナル、スプライシングシグナルなどを有するプラスミドを用いることができる。

具体的に好適なプラスミドとしては、本発明者らによって造成されたpAGE103 [水上ら:ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 101, 1307~1310 (1987)]、pSE1PA1-9AやpSE1PA1SE1dhfr1-9A (参考例9)などがあげられる。

pAGE103を含む大腸菌は Escherichia coli EAGE103 (FERM BP-1312) として昭和62年3月23日付で微生物研究室に寄託されている。また、ジヒドロ葉酸還元酵素 (以下dhfrと略記する) 遺伝子を選択マーカーとして有するプラスミドとしては、例えば、pSV2-dhfr [エス・サブラマニ (S. Subramani) ら:モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジ

ル化ポリペプチドをコードするDNAを組み込んだ組換え体プラスミドを造成する例を以下に述べる。

まず、hG-CSF前導体hG-CSF (ND28) (参考例16参照) を動物細胞で発現させるための組換え体プラスミドpAS28を造成する例を述べる。

第5図に示したようにして、pAS3-3 (参考例10) をM1uIとApaLIで切断後、約3.0kbのDNA断片を精製する。また同プラスミドをAattIIとM1uIで切断後、約6.3kbのDNA断片を精製する。一方、pCFBD28 (参考例16参照) をAattIIとXbaIで切断後、約0.3kbのDNA断片を精製する。これら3つのDNA断片と第5図に示した合成DNAをT4DNAリガーゼにより結合し、pAS28を得る。

次に、hG-CSF (ND28) のN末端より第6目のアミノ酸残基にN-グリコシド結合型糖鎖の付加部位を有する新規hG-CSFプラスミドをコードする組換えプラスミドpASN6

イ (Mol. Cell. Biol.) 1, 854 (1981)]などがあげられる。

hG-CSF、UKあるいはt-PAの新規ポリペプチドおよび新規グリコシル化ポリペプチドをコードするDNAとベクターDNAとの組換えは、制限酵素を用いて両DNAを消化後、T4DNAリガーゼを用いて結合する一般的組換えDNA技術を用いて行うことができる。結合に際しては、制限酵素を用いて消化したDNA断片の末端を、DNAポリメラーゼI・クレノー断片を用いる埋め込み反応、T4DNAポリメラーゼを用いる埋め込み反応または削り込み反応を利用して加工する方法やDNAリンクーを用いる方法によっても行うことができる。

hG-CSFcDNAを持つプラスミドとしてpCSF2をp_{ro}-UKcDNAを持つプラスミドとしてpUK1およびpUK11を用い、また必要な場合には、化学合成したDNAリンクーや部位特異的変異を用いて、hG-CSF、およびUKの新規ポリペプチドあるいは新規グリコシ

を造成する例について述べる。

第6図に示したようにして、pAS3-3をM1uIとApaLIで切断後、約3.0kbのDNA断片を精製する。また、pAS28をXbaIとM1uIで切断後、約6.5kbのDNA断片を精製する。これら2つのDNA断片と第6図に示した合成DNAをT4DNAリガーゼにより結合し、pASN6を得る。

次に、hG-CSF (ND28) のN末端より第145番目のアミノ酸残基にN-グリコシド結合型糖鎖の付加部位を有する新規hG-CSFポリペプチドをコードする組換え体プラスミドpASN145を造成する例を述べる。

pASN145の造成は部位特異的変異を用いて行う。第7(1)図に示すように、pCFBD28をPvuIIとBamHIで切断後、約0.94kbのDNA断片を精製する。また、M13ファージベクターのM13mp19RF DNAをSmaIとBamHIで切断後、約7.24kbのDNA断片を精製する。こうして得られる2つのDNA断片を

T4 DNAリガーゼにより結合し、p_t19BD28Cを得る。ついで、このp_t19BD28Cを大腸菌JM105にトランスフェクションし、得られたファージより一本鎖p_t19BD28Cを得る。同じ第7(II)図に示すようにして、M13mp19RFDNAをHindIIIとEcoRIで切断後、約7.2kbのDNA断片を精製する。この約7.2kbのDNA断片と上記で得られた一本鎖p_t19BD28Cを混合し、変性処理の後再びアニールさせることによりギャップト・デュプレックスDNAを生成させ、これを精製する。ついで、このギャップト・デュプレックスDNAに第7(II)図に示した合成DNAをアニールさせた後、クレノー断片とT4 DNAリガーゼにより現状化する。この現状化DNAを大腸菌JM105株にトランスフェクションし、部位特異的の変異が導入されたp_t19BD28CN145を得る。

次に第7(II)図に示すようにしてp_t19BD28CN145をBglIIとBamHIで切断後、約0.85kbのDNA断片を精製する。一方、

D型端端を付加したUK構造体UK-S1を動物細胞内で表現する組換え体プラスミドpSE1UKS1-1dを造成する例を述べる。

第9図に示したようにして、pUK11(参考例2)をPstIとBamHIで切断した後、890bpのDNA断片を精製する。一方、M13mp18RFDNA(ヤニッシュ-ペロン(Yanisch-Perron)ら: ジーン(Gene)33, 103(1985)をPstIとBamHIで切断した後、約7.2kbのDNA断片を精製する。このようにして得られる両DNA断片をT4 DNAリガーゼにより結合し、UK-cDNAの一部をM13mp18ベクターにサブクローン化したプラスミドpUKmpS1を得る。

次いで、常法によりpUKmpS1の1本鎖DNAを精製した後、第10図に示したようにして、UKの184番目のアミノ酸残基にN-アセチルグリコシド型端端が付加されるように塩基配列を考える。すなわちPhe-184をAsnに変換するための合成DNA 5'-GGGGAGAAAAACA-CCACC-3' とM13mp18のDNA塩基配

pCFBD28をBamHIとBglII切断後、約3.25kbのDNA断片を精製する。こうして得られる2つのDNA断片を各々T4 DNAリガーゼで結合することにより、pCFBD28N145を得る。

次に、同じ第7(II)図に示すようにして、pCFBD28N145をBamIIIとBamHIで切断後、約1.3kbのDNA断片を精製する。こうして得た約1.3kbのDNA断片をDdeIで切断後、DNAポリメラーゼ・クレノー断片で処理することにより突出末端を埋め、さらにAatIIで切断後、約0.2kbのDNA断片を精製する。また、pAS28をAatIIとXbaIで切断後、約0.8kbのDNA断片を精製する。また、pSE1PA1SE1dhfr1-9A(参考例9)をSmaIとXbaIで切断後、約0.7kbのDNA断片を精製する。こうして得た約0.2kb、約0.8kb、約0.7kbの3つのDNA断片をT4 DNAリガーゼで結合することによりpASN145を得る。

次に、トロンビン切断部位近傍にN-アセチルグリコシ

別決定用の合成DNA

5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3'をプライマーとして、pUKmpS1の1本鎖DNAを大腸菌DNAポリメラーゼI・クレノー断片により2本鎖DNAに変換すると同時に、所望の位置に変異を導入する。このようにして変異を導入した2本鎖DNAをPstIとEcoRIで切断した後、約600bpのDNA断片を精製する。一方、UK-cDNAを運ぶpUK11(参考例3)をAatIIとPstIで切断した後、約1.0kbのDNA断片を精製する。また、UK-cDNAの3'末端側にKpnIサイトを導入したpUKB101(参考例12)をAatIIとEcoRIで切断した後、約2.9kbのDNA断片を精製する。このようにして得られる3種類のDNA断片をT4 DNAリガーゼにより結合し、UK構造体UK-S1をコードする組換え体プラスミドpUKS1を得る。

統いて、第11図に示したようにして、遺伝子增幅用のdhfr遺伝子を持つ外来遺伝子発現ベ

タター

pSE1PA1SE1dhfr1-9A (参考例9) をKpnIとXbaIで切断した後、約8KbのDNA断片を精製した。一方、UKを発現する組換え体プラスミドpSE1UKpro1-1A (参考例13) をXbaIとBglIIで切断した後、約0.75KbのDNA断片を精製した。また、UK-S1をコードするpUKS1をKpnIとBglIIで切断した後、約1.15KbのDNA断片を精製する。このようにして得られる3種類のDNA断片をT4 DNAリガーゼにより結合し、UK-S1を発現しうる組換え体プラスミドpSE1UKS1-1dを得る。

同様にしてUK-S3を発現しうる組換え体プラスミドpSEUKS3を得ることができる。

上記組換え技法における反応の条件は、一般的に下記のとおりである。

DNAの制限酵素による消化反応は通常0.1～2.0μgのDNAを2～200mM (好ましくは10～40mM) のTris-HCl (pH6.0～9.5好ま

[10mM Tris-HCl (pH7.5)、1mM EDTA] および二倍量のフェノール (TE緩衝液で飽和したもの) を加え、混合した後、-70℃と65℃での凍結-融解を2回繰り返し、さらに遠心分離によって生じる上層の水溶液を分取し、エタノール沈殿によってDNA断片を回収する方法である。DNA断片回収機・マックスイールYAE-3241型 (アト-株式会社製) を用いて、アガロースゲルやポリアクリルアミドゲルからDNA断片を電気泳動によって溶出し、精製できる [以下、この方法を電気泳動的溶出法 (electro-elution) と略称する]。

DNA断片の結合反応は、2～200mM (好ましくは10～40mM) のTris-HCl (pH6.1～9.5、好ましくはpH7.0～8.0)、2～20mM (好ましくは5～10mM) のMgCl₂、0.1～1.0mM (好ましくは0.5～2.0mM) のATP、1～50mM (好ましくは5～10mM) のジチオスレイトール (以下DTTともいう) を含む反応液中で、T4 DNAリガーゼ1～1,000単位を用い、

しくはpH7.0～8.0)、0～200mMのNaCl、2～20mM (好ましくは5～10mM) のMgCl₂を含む反応液中で、制限酵素0.1～100単位 (好ましくは1μgのDNAに対して1～3単位) を用い、20～70℃ (適温は用いる制限酵素により異なる) において、15分間～24時間行う。反応の停止は、通常55～75℃で5～30分間加熱することによるが、フェノールまたはジエチルピロカーボネートなどの試薬により制限酵素を失活させる方法も用いることができる。

制限酵素消化によって生じたDNA断片あるいはギャップト・デュブレックスDNAの精製は、低融点アガロースゲル電気泳動法 (以下、LGT法と略記する) [エル・ヴィスランダー (L. Mieslander) : アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry) 98, 305 (1979)] あるいはアガロースゲル・沈結融解法 (以下、AFT法と略記する) を用いて行うことができる。このAFT法とは、DNA断片を含むアガロースゲル (0.7～1.5%) のスライスに対して、等量のTE緩衝液

1～37℃ (好ましくは3～20℃) で15分間～72時間 (好ましくは2～20時間) 行う。

結合反応によって生じた組換え体プラスミドDNAは、必要によりコードする蛋白質の検査法 [エス・エヌ・コーエン (S. N. Cohen) ら: プロセーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.), U.S.A. 69, 2110 (1972)] あるいはハナハニの免疫伝播法 [Banahan: ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.) 168, 557 (1983)] を用いて、大腸菌に導入する。

結合反応によって生じた組み換え体M13ファージRF DNAは、必要により公知のトランスフェクション法 [口野嘉幸ら: 蛋白質・核酸・酵素 29, 294 (1984)] によって、大腸菌JM105株 (ジェイ・メシング (J. Messing) ら: ジーン (Gene) 33, 103 (1985)) に導入する。

組換え体プラスミドDNAおよび組み換え体M13ファージRF DNAを持つ大腸菌から該DNAの単離は、バーンボイムらの方法 [エイチ・シ

ー・バーンボイム (H. C. Birnboim) ら: ネクレイタ・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Res.) 7, 1513 (1979)】などを用いて行う。

組み換え体 M13 ファージからの一本鎖 DNA の準純は公知の方法 [口野嘉幸ら: 蛋白質・核酸・酵素 29, 294 (1984)] に従って行う。

本発明で使用するデオキシオリゴヌクレオチドは、リン酸アミダイト法による固相合成法 [S. L. Beaucage ら: テトラヘドロン・レターズ (Tetrahedron Lett.) 22, 1859 (1981)]、および L. J. McBrie ら: 同 24, 245 (1983)] に従い、アプライド・バイオシステムズ社 380A・DNA 合成機 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA 94404) を用いて合成することができる。合成されたデオキシオリゴヌクレオチドを他の DNA 断片と結合させる反応に用いる場合には、約 20 ピコモル (pmoles) のデオキシオリゴヌクレオチドを 20 μM の T4 キナーゼ緩衝液 [50 mM Tris-HCl (pH 7.6)、10 mM MgCl₂、5 mM DTT、0.1 mM EDTA、0.5 mM ATP] 中で、5 単位の T4

DNA キナーゼを加えることにより、5'-リン酸化する。ハイブリダイゼーション用のプローブとして用いる場合には、上記の T4 キナーゼ緩衝液の中の 0.5 mM ATP の代わりに 20~50 μCi の [γ -³²P] ATP (3000 Ci/mmol, Amersham, Arlington Heights, IL) を用いて、その 5' 末端を放射能標識する。

プラスミド DNA の構造解析については、プラスミド DNA を 1~10 種類の制限酵素で消化後アガロースゲル電気泳動あるいはポリアクリルアミドゲル電気泳動により切断部位を調べる。さらに DNA の塩基配列を決定する必要があるときは M13 ファージを用いたディオキシ・シーケンス (dideoxy sequence) 法によって決定する。

本発明のポリペプチドおよびグリコシル化ポリペプチドは大腸菌あるいは動物細胞を宿主として用いることにより、以下のようにして製造することができる。

まず、大腸菌を宿主として新規 hG-CSF ポリペプチドを生産する例について述べる。

プラスミド (例えば pCfBD28N145) を用いて大腸菌 K-12 MM294 株 (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 73, 4174, 1976) を形質転換させ、アンビシリン耐性 (Ap^r 以下同じ) のコロニーの中から pCfBD28N145 を有する大腸菌を選びだす。pCfBD28N145 を有する大腸菌を培地に培養することにより培養物中に新規 hG-CSF ポリペプチドを生成させることができる。

ここで用いる培地としては大腸菌の生育ならびに新規 hG-CSF ポリペプチドの生産に好適なものならば合成培地、天然培地のいずれも使用できる。

炭素源としては、グルコース、フラクトース、ラクトース、グリセロール、マンニトール、ソルビトールなどが、窒素源としては、NH₄Cl、(NH₄)₂SO₄、カゼミノ酸、酵母エキス、ポリペプトン、肉エキス、バクトトリプトン、コーン・スティーブ・リカーなどが、その他の栄養源としては K₂HPO₄、KH₂PO₄、NaCl、MgSO₄、ビタミン B₁、MgCl₂、

などが使用できる。

培養は pH 5.5~8.5、温度 18~40°C で通気搅拌培養により行われる。培養 5~90 時間で培養液中に新規 hG-CSF ポリペプチドが蓄積するので、培養物から菌体を濾過し、菌体を超音波処理により破砕し、遠心して得られる菌体残渣を得る。この菌体残渣からマーストンらの方法 [P. A. O. Marston ら: BIO/TECHNOLOGY 2, 800 (1984)] あるいはペニカラの方針 [Pennica et al.: ネイチャー (Nature) 301, 214 (1983)]、あるいはウィンタラーらの方法 [Winkler et al.: バイオ/テクノロジー (BIO/TECHNOLOGY) 3, 990 (1985)] を用いることにより、新規 hG-CSF ポリペプチドを抽出・精製・可溶化・再生することができる。

次に、動物細胞を宿主として新規 hG-CSF ポリペプチドあるいは新規 hG-CSF グリコシル化ポリペプチドを生産する方法について述べる。

新規 hG-CSF ポリペプチドあるいは新規 hG-CSF グリコシル化ポリペプチドを発現さ

せる際の主としては、該ポリペプチドあるいは該グリコシル化ポリペプチドを発現できるものならいかなる動物細胞も用いることができる。具体的に好適な動物細胞としては、d hfrが欠損したCHO細胞〔ジー・ウルラウプ&エル・エー・チャイシン(G. Ulrich & L. A. Chasin): Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216(1980)〕などがあげられる。

以下に、新規hG-CSFを発現しうるプラスミドとしてpASN6、宿主としてd hfrを欠損したCHO細胞を用いて新規hG-CSFポリペプチドあるいは新規hG-CSFグリコシル化ポリペプチドを製造する例を述べる。

プラスミドpASN6を例えればリン酸カルシウム法〔グラハム&ファン・アル・エブ(Graham & Van der Eb): ヴィロロジィ(Virology) 52, 546 (1978)〕によりd hfr欠損CHO株に導入する。pASN6を有する形質転換株は例えばG418-および透析ウシ胎児血清を含むMEM ALPHA培地(リボ核酸およびデオキシリボ核酸不含有:

メントーなどを用いることができる。培養は、通常細胞密度 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 細胞/mlとし、30~40℃、2~10日間行うと、各細胞密度に応じ、本免発物質が主に細胞外に分泌される。

培養物から細胞を遠心除去し、遠心後の上清から新規hG-CSFポリペプチドあるいは新規hG-CSFグリコシル化ポリペプチドを分離抽出する。

以上、hG-CSFの場合について、大腸癌あるいは動物細胞を宿主とした新規ポリペプチドおよび新規グリコシル化ポリペプチドの製造法について述べたが、UKあるいはその他の任意の蛋白質の場合も同様に製造することができる。

また上記のようにして得られたhG-CSF活性の測定は以下のようを行う。

8~12週令のC3H/Hc雄マウス(静岡実験動物協同組合)の大脳骨より骨髄細胞を無菌的にとり出し、牛胎児血清(FBS)を10%添加した α -Minimal Essential Medium(Flow Laboratories, 以下 α -MEM培地とす)に懸

ギブコ・オリエンタル社製)により選択することができる。さらに形質転換株の中からメソトレキセートを用いて新規hG-CSFポリペプチド遺伝子が増幅された形質転換株をすることもできる。得られた形質転換株を培地に培養することにより培養物中に新規hG-CSFポリペプチドあるいは新規hG-CSFグリコシル化ポリペプチドを生成させることができる。

培地としては、各種血清(例えばウシ胎児血清)を加えたハムF10培地、ハムF12培地(以上フローラボ社製)、ダルベッコMEM培地、RPMI-1640培地(以上日本製薬社製)、MEM ALPHA培地およびこれらの混合培地が用いられる。培地には必要により、グルタミン0.5~5mM、抗生素質〔ベニシリン(25U/ml)、ストレプトマイシン(25μg/ml)、G418(0.3mg/ml)など〕、慶留(0.01%)などを適量加えてよい。

培養には、種々の培養瓶、ディッシュ、ローラーボトル、スピナーフラスコ、ジャーファー

器する。この細胞(約 5×10^7 個)懸濁液1.5mlを、ナイロン・ウール(Nylon wool)(和光純薬、Nylon Fiber 146-04231)をつめたカラム(0.3g)に浸漬し、5%CO₂インキュベーター内にて37℃90分間吸収させる。次いで予め37℃に加温した α -MEM培地をカラムに流し、放出してくれるナイロン・ウール非吸着性の骨髄細胞を得る。この細胞を α -MEM培地で一回洗浄し、所定の濃度に調整する。

次いで、岡部らの方法[Okabe T. et al., Cancer Research 44, 4503-4506(1986)]に準じて骨髄造血幹細胞コロニー形成能を測定する。すなわち、 α -MEM 0.2ml、FBS 0.4mlおよび2枚離隔した各サンプル0.2mlの混液に、上記の方法で調整した骨髄細胞(2×10^6 個/ml)の0.2mlを混和する。これに42℃に保温した0.6%寒天(Difco, Agar purified #0560-01)液を等量(1.0ml)混和し、その0.5mlを24穴マルチディッシュ(Nunc社製、#143982)に播種する(5×10^4 個/dish, n=3)。5%CO₂、イ

ンキュベーター中で37℃7日間 置し、40倍以上上の細胞からなるコロニーの数を顕微鏡 (Olympus社製、140)で計数する。コロニー計数後、注意深くスライドグラス上にとり出し、アセトン・トルマリン混液で30秒間固定後、Kubotaらの方法 [Kubota K. et al.; *Exp. Hematology.* 8, 339-344 (1980)] でエヌテラーゼ2重染色を施し、各コロニーの同定を行う。

各サンプルの活性は、コロニー形成試験の2段階稀釈に於ける計数結果から以下の様に算出する。スタンダードとして用いたインタクトG-CSFのコロニー形成の最大値の1/2値を与える活性を50単位と定義し、これに各サンプルの稀釈率および単位1/2当りの活性に換算するため、20を乗じて活性(単位)とする。比活性は、単位蛋白質(ug)当たりの活性(単位/ug)で表示する。

また、hG-CSFの蛋白質量は、抗hG-CSF単クローン抗体を用いたエンザイム・リンクト・イムノ・ソルベント・アッセイ (ELISA)によって求める。なお、このときの標準物質とし

ては、大腸癌で生産、精製し、ローリー法によって定量したhG-CSF標品を用いる。また抗hG-CSF単クローン抗体は、花井らの方法 [花井ら: キャンサー・リサーチ (Cancer Res.), 46, 4438 (1986)] に従って調製したものを用いる。t-PAまたはUKの活性はフィブリン・プレート・アッセイ法 [Granelli-PipernoとReich: ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メデイシン (J. Exp. Med.) 148, 223 (1978)] によって測定することができる。

以下、本発明のポリペプチドあるいはグリコシル化ポリペプチドがhG-CSFまたはUKである場合の実施例を述べる。実施例1から5は、本発明のポリペプチドあるいはグリコシル化ポリペプチドがhG-CSFである場合の実施例で、実施例6から13はUKの場合の実施例である。

実施例1.

hG-CSF酵母体 hG-CSF (ND28)

(参考例16参照) を動物細胞で発現するための組換え体プラスミドpAS28の造成 (第5図参照)

黒) :

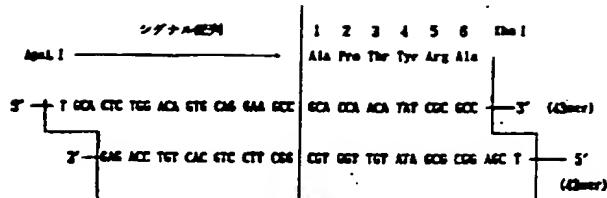
参考例10で得られたpAS3-3 2ugを10mM Tris-HCl (pH 7.5)、7mM MgCl₂、6mM 2-メルカプトエタノールおよび150mM NaClを含む緩衝液 (以下 "Y-150緩衝液" と略記する) 2.0ugに溶かし、制限酵素M1uI (宝酒造社製; 以下制限酵素については特記しない限りすべて宝酒造社製) を1.0単位加え、37℃で2時間消化反応を行った。その後、ApaLIを5単位加え、さらに37℃で10分間部分消化反応を行った。この反応液からLGT法により約3.0kbのDNA断片約0.5ugを精製、回収した。

また同プラスミド2ugを10mM Tris-HCl (pH 7.5)、7mM MgCl₂、6mM 2-メルカプトエタノールおよび50mM KClを含む緩衝液 (以下 "K-50緩衝液" と略記する) 2.0ugに溶かし、制限酵素AatII (東洋精機社製) を1.0単位加え、37℃で2時間消化反応を行った。その後、NaCl濃度が100mM

になるようにNaClを添加し、1.0単位のM1uIを加え、37℃でさらに2時間反応を行った。この反応液からLGT法により約6.3kbのDNA断片を約1ug精製、回収した。

別に、pCTBD28 (参考例16参照) 2ugをK-50緩衝液2.0ugに溶かし、制限酵素AatII (東洋精機社製) を1.0単位加え、37℃で2時間消化反応を行った。その後、NaCl濃度が50mMになるようにNaClを添加し、1.0単位のXbaIを加え37℃でさらに2時間消化反応を行った。この反応液からLGT法により約0.3kbのDNA断片約0.1ugを精製、回収した。

一方、成熟型hG-CSFのN末端のアミノ酸であるThrをAlaに、3番目のアミノ酸であるLeuをThrに、4番目のアミノ酸であるGlyをTyrに、5番目のアミノ酸であるProをArgに置換するために、下記のDNAリンクーを合成した。



まず、一本鎖DNA (43mer、2種) をアブライド・バイオシステムズ社380A・DNA合成器を用いて合成した。次に、合成したDNA (43mer、2種) をおののおの20ピコモルずつ、5.0 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1.0 mM MgCl₂、5 mM ジチオスレイトール、0.1 mM EDTA および 1 mM ATP を含む緩衝液 (以下この緩衝液を "T4キナーゼ緩衝液" と略記する) 40 μl に浴かし、T4ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造社製: 以下同じ) 30単位を加えて、37℃で60分間リン酸化反応を行った。

上記で得た、pAS3-3由来のM1uI-ApaL I断片 (約3.0 Kb) 0.5 μgと同プラスミド由来のAat II-M1uI断片 (約6.3 Kb)

C.Birnboim) ら: スタレイック・アッシュ・リナーチ (Nucleic Acids Res.) 7, 1513 (1979)]

(以下、プラスミドDNAの構造はこの方法を用いる) に従ってプラスミドDNAを準備した。

得られたプラスミドの構造は、制限酵素消化およびM13ファージを用いたディオキシ・シタエンス法により確認した。このプラスミドをpAS28 (第5回参照) と呼ぶ。プラスミドpAS28を含む微生物は *Escherichia coli* BAS28 PERM BP-2089として昭和63年9月24日付で微生物に寄託してある。該プラスミドがコードするポリペプチド (hG-CSF) は、成熟型hG-CSFに比べて以下のようにアミノ酸残基が置換されている。

1.0 μgおよびpCfBD28由来のAat II-Xba I断片 (0.3 Kb) 0.1 μgを2.0 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1.0 mM MgCl₂、1.0 mM ジチオスレイトールおよび1 mM ATP を含む緩衝液 (以下この緩衝液を "T4リガーゼ緩衝液" と略記する) 2.5 μl に浴かし、この混合液に上記DNAリンクーを約1ピコモル加えた。この混合液にさらにT4DNAリガーゼ (宝酒造社製: 以下同じ) 400単位を加え、4℃、18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて大腸菌HB101株 [ボリバー (Bolivar) ら: ジーン (Gene) 2, 75 (1977)] をコードする方法 (エス・エス・コーエン (S. S. Cohen) ら: プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA, 69, 2110 (1972)] (以下、大腸菌の形質転換にはこの方法を用いる) により形質転換し、アンビシリソ (Ap) 耐性株を得た。この形質転換株から公知の方法 [エイチ・シー・バーンボイム (H.

アミノ酸残基の位置 (hG-CSFのアミノ酸)	プラスミド
	pAS28
1番目 (Thr)	Ala
3番目 (Leu)	Thr
4番目 (Gly)	Tyr
5番目 (Pro)	Arg
17番目 (Cys)	Ser

pAS28がコードするポリペプチド (hG-CSF) を以後hG-CSF (ND28) と呼ぶ。

実験例2

hG-CSF (ND28) (参考例16参照) のN末端から第6番目のアミノ酸残基にN-アクリコシド結合型糖鎖の付加が可能となった新規hG-CSFポリペプチドをコードする組換え体プラスミドpASN6の造成 (第6回参照) :

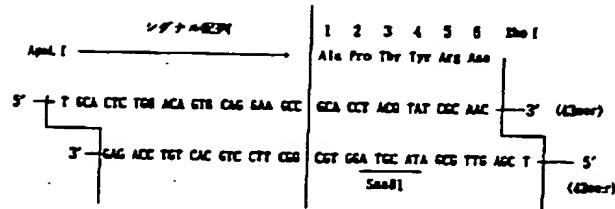
参考例10で得られたpAS3-3-2をY-150緩衝液 2.0 μl に浴かし、制限酵素M1uI 1.0単位を加え、37℃で2時間消化反応を

行った。その後、 Apa I を5単位加え、さらに37℃で10分間部分消化反応を行った。この反応液からLGT法により約3.0kbのDNA断片約0.5mgを精製、回収した。

別に、前項で得たpAS2-2由来の $\text{Y}-150$ 緩衝液2.0μlに添加し、制限酵素 Xba I と Mlu I をそれぞれ10単位加え、37℃で2時間消化反応を行った。この反応液からLGT法により、約6.55kbのDNA断片1.0mgを精製、回収した。

一方、実施例1のpAS2-2がコードするhG-CSF (ND28) のN末端から第6番目のアミノ酸であるAlaをAsnに置換し、N-アクリコシド結合型糖鎖の付加部位を形成するために下記のDNAリンクーを合成した。下記DNAリンクー中には新たにSnaB1切断部位が生じるように設計されているため、同リンクーが組み込まれたことは制限酵素SnaB1で切断することにより確認することができる。

アセトニトリルを加え、4℃で18時間結合反応を行った。組換え体プラスミドを含む反応混合物を用いて、大腸菌HB101株をコーエンらの方法(前記)により毛質転換し、 Ap^+ 耐性株を得た。この毛質転換株より、公知の方法に従って、プラスミドDNAを分離、精製した。該プラスミドDNAの構造は、制限酵素消化およびM13・ファージを用いたディディオキシ・シータエンス法により確認した。このプラスミドをpASN6と呼ぶ。プラスミドpASN6を含む微生物はEscherichia coli EASN6 PERM BP-2070として昭和63年9月24日付で筑工研に寄託してある。該プラスミドがコードするポリペプチド(hG-CSF構造体)は、成熟型hG-CSFと比べ以下のようにアミノ酸残基が置換されている。



一本鎖DNA(43mer、2種)はアプライド・バイオシステムズ社380A・DNA合成機を用いて合成した。

合成したDNA(43mer、2種)はおのおの20ピコモルずつ、40μlのT4キナーゼ緩衝液に添加し、T4ポリヌクレオチドキナーゼ30単位を加えて37℃で80分間リン酸化反応を行った。

上記で得たpAS3-3由来の Mlu I - Apa I 断片(約3.0kb)0.5mgとpAS2-2由来の Xba I - Mlu I 断片(約6.55kb)1mgを全量3.0μlのT4リガーゼ緩衝液に添加し、この混合液に上記DNAリンクーを約1ピコモル加えた。この混合液にさらに400単位のT4DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

アミノ酸置換の位置 (hG-CSFのアミノ酸)	プラスミド
	pASN6
1番目 (Thr)	Ala
3番目 (Leu)	Thr
4番目 (Gly)	Tyr
5番目 (Pro)	Arg
6番目 (Ala)	Asn
17番目 (Cys)	Ser

pASN6がコードするポリペプチド(hG-CSF構造体)を以後hG-CSF [ND28N6]と呼ぶ。

実施例3

hG-CSF [ND28] (参考例1・6参照)のN末端から第145番目のアミノ酸残基にN-アクリコシド結合型糖鎖の付加が可能となった新規hG-CSFポリペプチドをコードする組換え体プラスミドpASN145の造成(第7(1)図および第7(2)図参照)：

(1) 純型一本鎖DNA(一本鎖p198028C)の造成：

pCfBD28 (考例15 類) 3端を1.0 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM MgCl₂、6 mM 2-メルカプトエタノールを含む緩衝液（以下“Y-0緩衝液”と記する）2.0 μlに浴かし、制限酵素Pvu IIを10単位加え37℃で2時間消化反応を行った。その後、NaCl濃度が1.00 mMになるようにNaClを添加し、10単位のBamHIを加えて37℃でさらに2時間反応を行った。

この反応液からLGT法により、hG-CSF (ND28) のC末端部分をコードする約0.94 kbのDNA断片 (Pvu II-BamHI断片) 約0.5 μlを得た。

一方、M13ファージベクターであるM13mp19RFDNA (宝酒造社製) 1 μlを全量50 μlのY-0緩衝液に浴かし、制限酵素Sma Iを10単位加え、37℃、2時間消化反応を行った。その後、NaCl濃度が1.00 mMになるようにNaClを添加し、制限酵素BamHIを10単位加え37℃、2時間消化反応を行った。この反

応液からLGT法により約7.24 KbのDNA断片 (Sma I-BamHI断片) 約0.8 μlを得た。

上記で得たPvu II-BamHI断片 (約0.94 kb) 0.2 μlと、Sma I-BamHI断片 (約7.24 kb) 0.05 μlをT4リガーゼ緩衝液5.0 μlに浴かし、この混合液にT4DNAリガーゼ400単位を加え12℃、16時間結合反応を行った。

次に、公知の方法 [メシング (Messing) ら: メソッド・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology) 101, 20 (1983)] に従い、上記反応液を用いて大腸菌JM105株をトランスクレクションし、組換え体ファージを得た。この組換え体ファージの感染した大腸菌JM105株の培養液より、プラスミドDNA回収法に準じて、組換え体M13ファージRFDNAを回収した。このRFDNA (これをpt19BD28Cと呼ぶ) の構造は、BamHI, EcoRI, BglIIで切断し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により確認した。この組換え体ファージより、前記公

知の方法に従って一本鎖pt19BD28Cを回収し錠型とした。

(4) ギャップト・デュプレックスDNA (Gapped Duplex DNA) の造成:

M13mp19RFDNA (宝酒造社製) 3 μlを1.0 mM Tris-HCl (pH 7.5)、7 mM MgCl₂、6 mM 2-メルカプトエタノールおよび1.00 mM NaClを含む緩衝液（以下“Y-1.00緩衝液”と略記する）3.0 μlに浴かし、制限酵素EcoRIとHindIIIをそれぞれ10単位ずつ加え、37℃で2時間消化反応を行った。この反応液からLGT法により約7.2 KbのDNA断片 (EcoRI-HindIII断片) 約2.5 μlを得た。

このmp19RFDNA由来のEcoRI-HindIII断片 (約7.2 Kb) 2 μlと前項で得た錠型一本鎖DNA, pt19BD28C 1 μlを5.0 mM Tris-HCl (pH 7.8)、7 mM MgCl₂、および6 mM 2-メルカプトエタノールを含む緩衝液（以下“タレノー緩衝液”と略

記する）2.7 μlに浴かし、100℃で6分間煮沸することによりDNAを変性させた。その後、65℃で10分間、37℃で40分間、4℃で40分間、水中で10分間放置し、アニール反応を行い錠型中のhG-CSF遺伝子部分だけが一本鎖となったギャップト・デュプレックスDNAを生成させた。生成したギャップト・デュプレックスDNAはLGT法により回収した。

(5) 突然変異誘発 (pt19BD28C×145の造成)

実施例1で得たpAS28がコードするhG-CSF (ND28) のN末端から第145番目のアミノ酸であるGlnをAsnに、第147番目のアミノ酸であるArgをSerに置換し、N-グリコシド結合型糖鎖の付加部位を形成するため、以下に示す一本鎖DNAを合成した。下記一本鎖DNA中には、新たにPvu Iサイトが生じるよう設計されているので、突然変異が導入されたものはこれを制限酵素Pvu Iで切断することにより確認することができる。

一本鎖DNAの合成は、アブライド・バイオシステムズ社380A・DNA合成器を用いて行った。合成した一本鎖DNA 1端を50端のT4キナーゼ緩衝液に溶かし、T4ポリヌクレオチドキナーゼ30単位を加えて37℃で80分間リン酸化反応を行った。

次に、このリン酸化した1本鎖DNA 0.2 μ gと前項で得たギャップト・デュプレックスDNA 0.1 μ gを6.5 mM Tris-HCl (pH 7.5)、8 mM MgCl₂、1 mM 2-メルカプトエタノールおよび100 mM NaClを含む緩衝液34 μ lに溶かし、65℃で60分間、室温で30分間放置し、1本鎖DNAをギャップト・デュプレックスDNAにアニールさせた。

この接着に dATP、dTTP、dCTP、

Φ DNA 断片 (Bgl I - Bam HI 断片) を 0.4 μg 量た。

一方、pCfBD28 (参考例16参照) 2 μgを50 μgのY-100凝集液に浴かし、制限酵素BamHIを10単位加え37℃で2時間消化反応を行った。その後、制限酵素BglIを5単位加え、37℃でさらに10分間部分消化反応を行った。この反応液からLGT柱により、約3.25 kbのDNA断片 (BamHI-BglI断片) を0.5 μg得た。

上記で得た pT19BD28CN145 由来の
Bg II - BamHI 断片 (約 0.85 kb) 0.4 μg
と pCFBD28 由来の Bg II - BamHI 断
片 (約 3.25 kb) 0.5 μg を T4 リガーゼ緩衝液
6.0 μl に添加し、400 単位の T4 DNA リガ
ーゼを加え、1.2% T1.5 防酸化板を用いた

該反応液を用いた大腸菌 HB 101 棒を培養板接着し、 λ p 耐性株を得た。該培養板接着よりプラスミド DNA を単離し 制限酵素切断により構造解析を行った。目的の構造を有するプラスミド DN

dGTPをそれぞれ0.5 mMになるように加えた後、1.5単位のDNAポリメラーゼI・クレノー断片と400単位のT4 DNAリガーゼを加え、4℃、18時間の伸長反応を行った。

該反応液を用いて大腸菌JM105をトランスフェクションし、変異導入ファージを得た。変異導入ファージの感染した大腸菌JM105上りRF DNAを回収し、制限酵素切断およびM13ファージを用いたディディオキシ・シークエンス法により構造確認を行った。目的の変異が導入されたRF DNAをp_t19-BD28CN145と呼ぶ。

44 PC + BD 28 N 145 の造成 (第7回図
用)

前項で得た p t 1 9 B D 2 8 C N 1 4 5 3 μ g を 50 μ l の Y-100 細胞液に浮かし、制限酵素 B g E I (ペーリングー・マンハイム社製) および B a m H I をそれぞれ 10 単位加え、37°C で 2 時間消化反応を行った。反応液から L G T 法により、前項で導入した変異部位を含む約 0.85 Kb

Aを△C f BD28N145と呼ぶ。

(e) PASN 145 の造成

前項で得た pCf. BD 28 N 145、5 級を 50 μg の Y-100 級核酸に溶かし、制限酵素 Ban III (東洋紡績社製) および Bam HI を各々 10 単位加え、37°C で 2 時間消化反応を行った。この反応液から LGT 法により約 1.3 Kb の DNA 断片 (Ban III-Bam HI 断片) 1 級を得た。この約 1.3 Kb の DNA 断片 1 級を 50 μg の Y-100 級核酸に溶かし、制限酵素 Dde I (東洋紡績社製) を 10 単位加え 37°C で 2 時間消化反応を行った。フェノール-クロロホルム等量混合液による抽出 (以下フェノール-クロロホルム抽出と略記する) およびエタノール沈殿で DNA を回収し、30 μg のクレノー核酸に溶かし、DNA ポリメラーゼ I・クレノー断片を 2 単位加え 37°C で 1 時間反応を行った。88°C で 10 分間加熱し DNA ポリメラーゼ I・クレノー断片を失活させ後、エタノール沈殿で DNA を回収した。回収した DNA は、20 μg の K-50 級核酸に溶

かし、制限酵素 *Aat* II (東洋紡績社製) 10 単位を加えて 37℃、2 時間消化反応を行った。この反応液より L GT 法により約 0.2 kb の DNA 断片 (*Dde* I (平坦末端) - *Aat* II 断片) 約 0.1 kb を得た。

別に実施例 1 で得た *pAS28* の 2 倍を 20 μM の K-50 種酵液に溶かし、制限酵素 *Aat* II (東洋紡績社製) 10 単位を加え、37℃で 2 時間消化反応を行った。その後、制限酵素 *Xba* I を 5 単位加え、37℃でさらに 10 分間部分消化反応を行った。この反応液より L GT 法により約 0.8 kb の DNA 断片 (*Aat* II - *Xba* I 断片) 約 0.1 kb を得た。

一方、参考例 9 で得た *pSB1PAISB1dhfr1-9A* 2 倍を 20 μM の Y-0 種酵液に溶かし、制限酵素 *Sma* I を 10 単位加え、37℃で 2 時間消化反応を行った。その後、NaCl 濃度が 100 mM になるように NaCl を添加し、制限酵素 *Xba* I を 10 単位加え、37℃でさらに 2 時間消化反応を行った。この反応液から L GT 法により約 8.7

kb の DNA 断片 (*Sma* I - *Xba* I 断片) 約 1 kb を得た。

上記のようにして た *pCfBD28N145* 由来の *Dde* I (平坦末端) - *Aat* II 断片 (約 0.2 kb) 約 0.1 kb、*pAS28* 由来の *Aat* II - *Xba* I 断片 (約 0.8 kb) 約 0.1 kb、*pSE1P* *A1SE1dhfr1-9A* 由来の *Sma* I - *Xba* I 断片 (約 8.7 kb) 約 1 kb を 30 μM の T4 DNA リガーゼ 種酵液に溶かし 400 単位の T4 DNA リガーゼを加え、4℃で 18 時間結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 HB101 株を感受性株とし、A+ 酵性株を得た。該形質転換株よりプラスミドを単離し、制限酵素切削による構造解析を行った結果、目的の構造を有するプラスミド DNA、*pASN145* を得た。プラスミド *pASN145* を含む微生物は *Escherichia coli* *BSNI45* FERM BP-2071 として昭和 63 年 9 月 24 日付で微生物工研に寄託してある。該プラスミドがコードするポリペプチド (*hG-CSF* 前導体) は、成熟型 *hG-CSF* と比べて以下のようにアミノ

酸残基が置換されている。

アミノ酸置換の位置 (<i>hG-CSF</i> のアミノ酸)	プラスミド
	<i>pASN145</i>
1番目 (Thr)	Ala
3番目 (Leu)	Thr
4番目 (Gly)	Tyr
5番目 (Pro)	Arg
17番目 (Cys)	Ser
145番目 (Gln)	Asn
147番目 (Arg)	Ser

pASN145 がコードするポリペプチド (*hG-CSF* 前導体) を以後 *hG-CSF* [*ND28N145*] と呼ぶ。

実施例 4

hG-CSF [*ND28*]、*hG-CSF* [*ND28N8*]、*hG-CSF* [*ND28N145*] および *hG-CSF* の動物細胞による生産：
〔1〕 *pAS28* を保有する動物細胞による *hG-CSF* [*ND28*] の生産：

pAS28 の *dhfr* 欠損 CHO 株への導入はリシン酸カルシウム法に準じて行った。すなわち、*PC10* % と 7.5 % *NaHCO3* 溶液 [フローラボラトリーズ (Flow Laboratories) 社製] 1/50 倍を加えた MEM ALPHA 培地 (リボ核酸およびデオキシリボ核酸含有：ギブコ・オリエンタル社製) [以下、この培地を MEM α (非選択培地) と略記する] 5 ml に 1×10^6 細胞/ml になるように細胞を接種し [培養には直径 8 cm のディッシュを使用した： LUX 社製 (以下、培養には LUX 社のディッシュを用いた)]、37℃、CO₂ インキュベーターにて 1 日間培養した。一方、*pAS28* の 1.0 kb を 450 μM の 1.0 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液に溶解し、この溶液に 500 μM の 28.0 mM NaCl、1.5 mM Na₂HPO₄、50 mM HEPES (N-2-ヒドロキシエチルビペタジン-N' - 2-エタンスルファン酸) (pH 7.1) を含む溶液を加えて混合した。さらに 50 μM の 2.5 M CaCl₂ 溶液を加えて混合し、

室温で5分間 潜した。このDNA溶液全量を、
地を除き新しい MEM α (非選択培地) 10mlを加
えてさらに1時間培養したdhfr欠損CHO
株に添加し、8時間インキュベートした。PBS
で細胞を洗浄し、5mlのMEM α (非選択培地)
を加えて16時間培養した。細胞をPBS
[NaCl 8g/l, KC1 0.2g/l,
Na₂HPO₄ (無水) 1.15g/l, KH₂PO₄
0.2g/l] で洗浄し、0.05%トリプシン、
0.02%EDTA (エチレンジアミン4酢酸)
を含む溶液3mlを加え、余分の溶液を除いた後、
37℃に5分間インキュベートした (トリプシン
処理)。透析PCS (ギブコ・オリエンタル
社製)を10%、7.5% NaHCO₃ 溶液を
1/50量、100×非必須アミノ酸溶液を1/100
量、G418 (ギブコ・オリエンタル社製)を
0.3mg/mlになるように加えたMEM ALP
HA培地 (リボ核酸およびアオキシリボ核酸不
含有) [以下、この培地をMEM α (選択培地)
と略記する]を加えてよく細胞を懸滴し、直径

10cmのディッシュを用い、37℃、CO₂イ
ンキュベーターにて5日間培養した。PBSで
細胞を洗浄し、MEM α (選択培地)を加えて
5日間培養した。同様の操作をして、さらに5
日間培養した。PBSで細胞を洗浄した後、ト
リプシン処理し、10mlのMEM α (選択培地)
を加えて細胞を懸滴し、直径8cmのディッシュ
を用い、37℃、CO₂インキュベーターにて
3~7日間培養した。出現してきたコロニーを
トリプシン処理した後、50mMのメソトレキセ
ト (以下、MTXと略記する)を含む10mlのM
EM α (選択培地)を用いて細胞濃度 5×10^4
/mlになるように直径10cmのディッシュ1枚に
植え込んだ。5日おきに上記培地を用いて培地
の交換を計3回行った。出現してきたMTX耐
性のコロニーを単コロニー分離し、各々直径6
cmのディッシュを用い、コンフルエントになる
まで培養した。その後、PCSを含まないME
M α (選択培地)に交換し、2日後、培養液中
のhG-CSF (ND28) の生産量を調べた

ところ、クローンNo.22が最も多く、そのhG
-CSF (ND28) 生産量は1.0mg/10⁶細胞・2日であった。このクローンを、100ml
の50nM MTXを含むMEM α (選択培地)を含
むファルコン(Falcon)3027型ローラー・ボトル
で培養し、コンフルエントになった後、PCS
を除去した上記培地を用い、3日間培養した。
この100mlの培養液は実施例5で用いた。

② pASN145を保有する動物細胞によるhG- CSF (ND28N145) の生産：

pASN6およびdhfr欠損CHO細胞株を用
いて、上で述べた手順と同様の手順で、hG-
CSF (ND28N6) を生産する細胞株を得た。この中でクローンNo.16の生産量が最も多く、
その生産量は7mg/10⁶細胞・2日であった。
このクローンを、100mlの50nM MTXを含む
MEM α (選択培地)を含むファルコン3027型ロ
ーラー・ボトルで培養し、コンフルエントにな
った後、PCSを除去した上記培地を用い、3
日間培養した。この100mlの 培養液は実施例

5で用いた。

③ pASN145を保有する動物細胞による hG-CSF (ND28N145) の生産：

pASN145およびdhfr欠損CHO細
胞株を用いて、上で述べた手順と同様の手順で、
hG-CSF (ND28N145) を生産する
細胞株を得た。この中でクローンNo.9の生産量
が最も多く、その生産量は7mg/10⁶細胞・
2日であった。このクローンを、100mlの
50nM MTXを含むMEM α (選択培地)
を含むファルコン3027型ローラー・ボトル
で培養し、コンフルエントになった後、PCS
を除去した上記培地を用い、3日間培養した。
この100mlの培養液は実施例5で用いた。

④ pAS3-3を保有する動物細胞によるhG- CSFの生産：

参考例10で得られたpAS3-3および
dhfr欠損CHO細胞株を用いて、上で述べ
た手順と同様の手順で、hG-CSFを生産す
る細胞株を得た。この中でクローンNo.5の生産

量が最も多く、その生産量は10ml/10cm²瓶・2日であった。このタローンを、100mlの50nM MTXを含むMEMα(選択培地)を含むファルコン3027型ローラー・ボトルで培養し、コンフルエントになった後、PCSを除去した上記培地を用い、3日間培養した。この100mlの培養液は実施例5で用いた。

実施例5.

hG-CSFの糖鎖導入型供導体、hG-CSF[ND28]、hG-CSF[ND28N8]およびhG-CSF[ND28N145]のプロテアーゼ抵抗性とhG-CSF[ND28N8]の熱安定性に関する検討

(1) 糖鎖付加の確認

実施例4で得た天然型hG-CSF、hG-CSF[ND28]、hG-CSF[ND28N8]あるいはhG-CSF[ND28N145]を含有する無血清培養液から、遠心により細胞を完全に除去した後、各サンプル15μlをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(レムリ

と)を付加する糖鎖には、シアル酸を1個含むものと2個含むものの2種があることも知られている【大枝ら：ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.)、103, 544(1988)】。本研究においても、同様にCHO細胞で生産したhG-CSFにはO-グリコシド結合型糖鎖が一本付加していた。また付加する糖鎖には、シアル酸を1個含むものと2個含むもののが存在していた。第8(1)図または第8(2)図で見られるhG-CSFの2本のバンドはシアル酸の数の違いによるものである。

これに対しCHO細胞で生産されたhG-CSF[ND28]には、O-グリコシド結合型糖鎖が1つ付加したものに加え2本付加したものも存在していることが判明した。また、hG-CSF[ND28]にN-ダリコシレーション結合部位を新たに導入したhG-CSF[ND28N8]およびhG-CSF[ND28N145]では、ともに生産される全hG-CSFの約1/3にN-グリコシド結合型糖鎖が付加していた。

(Lacemli): ネイチャー (Nature) 227, 680 (1970)】に供した。この際、プラスミドDNAを含まないCHO細胞の培養上清と、大腸菌で生産、精製したhG-CSFおよびhG-CSF[ND28] (参考例16参照) も合わせて SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。泳動後ゲルを蛋白染色 (和光純薬社製の銀染色キットを使用) したパターンを第8(1)図に示す。一方、同一ゲル上の蛋白質をニトロセルロース膜に移した後、抗hG-CSF单クローン抗体を用いて酵素抗体染色 (田部一史、細胞工学、2, 1061(1983)) を行ったものが第8(2)図である。抗hG-CSF单クローン抗体は、花井らの方法【花井ら：キャンサー・リサーチ (Cancer Res.), 46, 4438 (1986)】を使って調製したものを用いた。

天然のhG-CSFあるいはCHO細胞で生産されるhG-CSFは、N末端より第133番目のThr残基にO-グリコシド結合型糖鎖が1本付加することが知られている。またその

その際、hG-CSF[ND28N145]においては、hG-CSF[ND28]の場合と同様に、新たなO-グリコシド結合型糖鎖が付加されたものも存在していた。したがってhG-CSF[ND28N145]の場合、付加する糖鎖の種類と数の違いにより4種のポリペプチドが存在している。すなわち、天然型と同様に一本のO-グリコシド結合型糖鎖が付加したもののか、O-グリコシド結合型糖鎖が2本付加したもの、O-グリコシド結合型糖鎖が1本、N-ダリコシド結合型糖鎖が1本付加したものおよびO-グリコシド結合型糖鎖が2本、N-グリコシド結合型糖鎖が1本付加したもののが存在している。一方、hG-CSF[ND28N8]には、新たなO-グリコシド結合型糖鎖の付加はほとんどない。

なお、N-ダリコシド結合型糖鎖が付加していることは、N-グリコシド結合型糖鎖とポリペプチドの結合部分を切断する酵素であるN-グリカナーゼ (生化学工業) で処理することに

より確認した。O-グリコシド結合型糖鎖の場合は、O-グリカナーゼおよびシアターゼ（ともに生化学工業）を用いて確認した。第8回図は、第8回図の模式図であり、各々のバンドが有する糖鎖の種類と数について記してある。

④ プロテアーゼ抵抗性の検討

前項で示したように、CHO細胞で生産したhG-CSF [ND28]、hG-CSF [ND28N6] およびhG-CSF [ND28N145] には、各々新たな糖鎖が付加したものと付加しないものが存在していた。そこで新たな糖鎖が付加したものと付加しないものを両方含んでいる前項の培養上清に直接キモトリプシンを加えることにより、糖鎖の付加の有無によるプロテアーゼ抵抗性を比較した。hG-CSF [ND28]、hG-CSF [ND28N6] およびhG-CSF [ND28N145] を各々含有する前項の培養上清 450 μl に 0.5 mg/ml のキモトリプシン [シグマ (Sigma) 社製] を各々 2 μl 加え、37℃で保温した。キモトリプシンを

添加後 10, 20, 30, 60, 120, 180 分後に 50 μl ずつ採取し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動用の緩衝液 [0.25M Tris-HCl (pH 6.8)、8% ラウリル硫酸ナトリウム (SDS)、40% グリセロール、0.004% ブロムフェノールブルー] を 20 μl 添加することにより反応を停止させた。またキモトリプシンを添加しないサンプルも調製し、これをキモトリプシン添加後 0 分の試料とした。

次に各試料 20 μl を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、その後ニトロセルロース膜にポリペプチドを移した後、前項と同様にして酵素抗体染色を行った。その結果、hG-CSF [ND28]、hG-CSF [ND28N6]、hG-CSF [ND28N145] のいずれの場合においても、新たな糖鎖の付加したものは添加しないものに比べてキモトリプシン抵抗性になっていることが判明した。

hG-CSF [ND28] においてはO-グ

リコシド結合型糖鎖が 1 本付加しているもの (天然型) よりは 2 本付加しているものの方がキモトリプシン抵抗性になっていた [第8回図]。また hG-CSF [ND28N6] の場合、N-グリコシド結合型糖鎖が新たに付加したものの方が付加していないものより抵抗性になっていた [第8回図]。hG-CSF [ND28N145] の場合は、O-グリコシド結合型糖鎖を 1 本もつもの (天然型) と、O-グリコシド結合型糖鎖が新たに 1 本付加したもの、N-グリコシド結合型糖鎖が新たに付加したもの、および両方が新たに付加したものの 4 種のポリペプチドが存在しているが、この場合も N-グリコシド結合型糖鎖が新たに付加したものの方が抵抗性になっていた。また、N-グリコシド結合型糖鎖に加え O-グリコシド結合型糖鎖が新たに付加したものではさらに抵抗性になっていた [第8回図]。

⑤ 热安定性に関する検討

実施例 4 回で た、hG-CSF [ND28]

N6] を含有する無血清培養液 5 ml をセルカット-10 (ミリボア社製) を用いて 500 ml に濃縮した。次に、そのうちの 100 ml を Superose 12 カラム (ファルマシア社製) (1 cm × 30 cm) に通塔し、N-グリコシド結合型糖鎖の付加した hG-CSF [ND28N6] のみを分取した。クロマトグラフィーには、0.1M Tris-HCl (pH 8.0)、0.2M NaCl、1 mM EDTA を含む緩衝液を使用した。通塔は 0.5 ml/min で行った。上記クロマトグラフィーを 3 回繰り返し、N-グリコシド結合型糖鎖の付加したヒト G-CSF [ND28N6] を含む溶液 (ヒト G-CSF 濃度は約 1.7 mg/ml) を約 1.5 ml 得た。この溶液 350 μl に、1% ツイーン (Tween) 20 を 3.5 μl と N-グリカナーゼ (生化学工業社製) を 1 μl (0.25 Units) 加え、37℃で 17.5 時間反応を行い、N-グリコシド結合型糖鎖の除去を行った。また、N-グリカナーゼのかわりに試験水を 1 μl 加えたのも同時に調製し、同様に反応に供した。反応

終了後両反応液の一部を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動に供し、その後銀染色を行うことにより、N-グリコシド結合型糖鎖が除去においては、N-グリコシド結合型糖鎖が除去されていることを確認した。

上記の両反応液は、反応終了後直ちに 58℃での熱安定性の比較の実験に使用した。各反応液 8.0 μl を 58℃に保温し、0, 30, 120, 240, 360 分後に 1.0 μl ずつサンプリングを行い、マウスの骨髄造血幹細胞を用いたコロニー形成能試験により hG-CSP 活性を測定した。その結果を第 8 図に示す。図中の活性は、37℃で 17.5 時間保温した後の活性を 100%とした時の残存活性で示してある。なお、37℃で 17.5 時間保温後の活性は、保温前の活性を 100%としたとき、N-グリカナーゼ処理したものでは 48.1%、コントロールでは 86.8% であった。

第 8 図に示したように、N-グリコシド結合型糖鎖の付加した hG-CSP (ND28N)

酵素 Pst I と BamH I とをそれぞれ 1.0 単位ずつ加え、37℃で 2 時間消化反応を行った。65℃、10 分間の熱処理後、APTT 法を用いて約 7.2 kb の DNA 断片を精製した。

このようにして得られた pUK1 由来の 880 bp の DNA 断片と M13mp18RF 由来の約 7.2 kb の DNA 断片を全量 2.0 μl の T4リガーゼ緩衝液に溶かし、300 単位の T4 DNA リガーゼを加え、4℃で 18 時間結合反応を行った。

次に、公知の方法 [メシング (Messing) ら: メソッド・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology) 101, 20 (1983).] に従い、上記反応液を用いて大腸菌 JM105 株をトランスフェクションし、組換え体ファージを得た。続いて、公知の方法 [上記文献] に従い、この組換え体ファージを大腸菌 JM105 株に感染させた後、培養液から 1 本錠ファージ DNA を回収した。また、培養液より、プラスミド DNA を回収法にして、2 本錠ファージ DNA を回

6] (コントロール) は同糖鎖を除去した hG-CSP (ND28N8) (N-グリカナーゼ処理) よりも熱に対して安定であることが判明した。

実施例 6.

UK-S1 発現プラスミド pUSE1UKS1 -1 d の造成:

(1) 純型 1 本錠 DNA (1 本錠 pUKm pS1) の造成:

参考例 2 で得た約 3 μl の pUK1 を 3.0 μl の Y-100 緩衝液に溶かし、制限酵素 Pst I と BamH I をそれぞれ 1.0 単位ずつ加え、37℃で 2 時間消化反応を行った。65℃、10 分間の熱処理後、APTT 法 [バイオテクニクス (BioTechniques) 2, 66-67 (1984).] を用いて 880 bp の Pst I - BamH I DNA 断片を精製した。

一方、M13 ファージベクターである M13mp18RF DNA (宝酒造社製) 約 1 μl を全量 3.0 μl の Y-100 緩衝液に溶かし、制限

酵素 Pst I と BamH I とをそれぞれ 1.0 単位ずつ加え、37℃で 2 時間消化反応を行った。65℃、10 分間の熱処理後、APTT 法を用いて約 7.2 kb の DNA 断片を精製した。

この 2 本錠ファージ DNA (pUKm pS1) の構造は制限酵素消化により確認した (第 9 図参照)。

(2) オリゴスクレオチドを用いた UK-cDNA への変異の導入:

(A) 変異導入用合成 DNA の調製とリン酸化:

UK の 164 番目のアミノ酸残基 Phe を Asn に変え、精細を付加した UK 調導体 (この UK 調導体を以下、UK-S1 と略記する) を調製するため、17 基の合成 DNA
5'-GGGGAGAAACACCCAC-3' をアブライド・バイオシステムズ社 380A・DNA 合成器を用いて合成した。

次にこのようにして得られた合成 DNA 25 ピコモル (pmoles) を 1.0 μl の 50 mM Tris - HCl (pH 7.6)、1.0 mM MgCl₂、5 mM DTT、0.1 mM EDTA、0.5 mM ATP を含む培液中で、5 単位の T4 DNA リガーゼ (宝酒造社製) を加え、37℃で 30 分間反応させることにより、5' 端をリジ酸化し

特開平2-227075 (30)

た。

(B) 2種のオリゴスクレオチド・プライマーを用いる部位特異的変異の導入：

上で得られた1本鎖の組換えファージDNA 6.5 μ g (約2 μ gのDNAを含む) と 1 μ gの10倍濃度のポリメラーゼ緩衝液 (500 mM Tris-HCl (pH 7.8)、70 mM MgCl₂、80 mM 2-メルカプトエタノール、0.25 mM dATP、0.25 mM dCTP、0.25 mM dGTP および 0.25 mM dTTPを含む) と上記で得られた変異導入用合成DNA 2 μ g (2.5ピコモル) を混合した溶液を65℃に5分間、55℃に5分間、37℃に10分間、25℃に10分間放置した後、3単位の大腸菌DNAポリメラーゼI・クレノー (Klenow) 断片 (宝酒造社製) (以下、クレノー断片と略記する) を加え、25℃で30分間反応させた。次いで、この反応液に、1 μ gの10倍濃度のポリメラーゼ緩衝液と0.5 pmole/ μ gのM13プライマーM4 (宝酒造社

法を用いて約1.0 kbのAattII-PstI断片を精製した。別に参考例12で得られたpUKB101プラスミドDNA約3 μ gを30 μ gのY-50緩衝液に溶かし、10単位のAattIIと10単位のEcoRIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、APTT法を用い、約2.9 kbのAattII-EcoRI断片を精製した。

このようにして得られたpUK11由来のAattII-PstI断片 (約0.05 μ g) とpUKB101由来のAattII-EcoRI断片 (約0.1 μ g) と変異導入した約800 bpのPstI-EcoRI断片とを20 μ gのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、300単位のT4DNALigaーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌C600SP8株 [プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA 72,

628と3単位のクレノー断片を加え、37℃で10分間、25℃で40分間反応させた後、10 mM ATPを2 μ gと300単位のT4DNAリガーゼを加え、11℃で18時間結合反応を行った。この反応液に対して、フェノール抽出とクロロホルム抽出を行った後、エタノール沈澱によってDNA断片を回収した。このDNA断片を全量30 μ gのY-100緩衝液に溶かし、12単位のEcoRIと12単位のPstIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、APTT法を用いて約8.0 kbのPstI-EcoRI断片を精製した。

(C) 変異を導入したDNA断片のベクターへの組み込み

参考例3で得られたpUK11プラスミドDNA約3 μ gを30 μ gのY-50緩衝液に溶かし、10単位のAattII (東洋紡績社製) と8単位のPstIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、APTT

3418 (1975) を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からコロニーハイブリダイゼーション法を用いて、変異導入用合成DNA (上述) の5'末端を³²Pで放射能標識したプローブとハイブリダイズする組換えプラスミドpUKS-1を単離した。制限酵素消化による構造解析およびM13ファージを用いたディディオキシシーキエンス法により、pUKS-1が目的の構造を有することを確認した (第10図参照)。

pUK-S-1発現プラスミドpSE1UKS-1-1dの造成：

参考例9で得られたpSB1PAISE1dhfr1-9A プラスミドDNA約2 μ gを30 μ gのY-0緩衝液に溶かし、10単位のKpnIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。続いて1.5 μ gの2M NaClと10単位のXbaIを加え、さらに37℃で1時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、APTT法を用いて約8.6 kbのDNA断片を精製した。また、pSE1UK-1A プラスミドDNA約3 μ gを30 μ gのY

-100 級核酸に密かし、12 単位の Bgl II と 12 単位の Xba I を加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10 分間の熱処理後、アガロースゲル電気泳動法を用いて約 0.75 Kb の DNA 断片を精製した。一方、上で得られた pUKS1 プラスミド DNA 約 3 μg を 30 μg の Y-0 級核酸に密かし、15 単位の Kpn I を加え、37℃で2時間消化反応を行った。続いて 1.5 μg の 2 M NaCl と 12 単位の Bgl II を加え、さらに 37℃で1時間消化反応を行った。

65℃、10 分間の熱処理後、アガロースゲル電気泳動法を用いて約 1.15 Kb の DNA 断片を精製した。

このようにして得られた pSE1UKS1-dhfr1-9A 由来の約 8 Kb の DNA 断片 (約 0.1 μg)、pSE1UKpro1-1A 由来の約 0.75 Kb の DNA 断片 (約 0.02 μg)、および pUKS1 由来の約 1.15 Kb の DNA 断片 (約 0.02 μg) を全量 20 μg の T4 リガーゼ緩衝液に密かし、100 単位の T4 DNA リガーゼを加え、4℃で 18 時間結合反応を行った。

社製) 1/50 倍を加えた MEMα (非選択培地) 5 ml に 1×10^4 細胞/ml になるように細胞を播種し (培養には直径 6 cm のディッシュを使用した: LUX 社製 (以下、培養には LUX 社のディッシュを用いた))、37℃、CO₂ インキュベーターにて 1 日間培養した。一方、pSE1UKS1-1d DNA 1.0 μg を 450 μl の 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 緩衝液に溶解し、この溶液に 500 μl の 280 mM NaCl、1.5 mM Na₂HPO₄、5.0 mM HEPES (N-2-ヒドロキシエチルビペラジン-N'-2-エタンスルファン酸) (pH 7.1) を含む溶液を加えて混合した。さらに 50 μl の 2.5 M CaCl₂ 緩衝液を加えて混合し、室温で 5 分間静置した。この DNA 溶液全量を、培地を除き新しい MEMα (非選択培地) 1.0 ml を加えてさら 1 時間培養した dhfr 欠損 CHO 様に添加し、8 時間インキュベートした。PBS で細胞を洗浄し、5 ml の MEMα (非選択培地) を加えて細胞を懸滴し、直径 6 cm のディッシュを用い、37℃、CO₂ インキュベーターにて 3

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌 MM294 株を感受性株とし、A + 耐性株を得た。この感受性株からプラスミド DNA、pSE1UKS1-1d を単離し、制限酵素消化による構造解析を行ったところ、pSE1UKS1-1d は目的の構造を有することを確認した (第 1 図参照)。

プラスミド pSE1UKS1-1d を含む微生物は Escherichia coli EKUS1-1d PERM BP-2072 として昭和 63 年 9 月 24 日付で微生物研究所に寄託している。

実施例 7.

UK-S1 および pTK-UK ポリペプチドの動物細胞による生産:

(1) pSE1UKS1-1d を保有する CHO 細胞による UK-S1 ポリペプチドの生産:

実施例 6 で得られた pSE1UKS1-1d の dhfr 欠損 CHO 様への導入はリン酸カルシウム法に準じて行った。すなわち、FCS 1/10 倍および 7.5% NaHCO₃ 溶液 (Flow Laboratories

PBS (NaCl 8 g/l, KCl 0.2 g/l, Na₂HPO₄ (無水) 1.15 g/l, KH₂PO₄ 0.2 g/l) で洗浄し、0.05% トリプシン、0.2% EDTA (エチレンジアミン四酢酸) を含む溶液 3 ml を加え、余分の溶液を除いた後、37℃に 5 分間インキュベートした (トリプシン処理)。透析 FCS (ギブコ・オリエンタル社製) を 1.0%、7.5% NaHCO₃ 溶液を 1/50 倍、1.00 × 非必須アミノ酸溶液を 1/100 倍、G418 (ギブコ・オリエンタル社製) を 0.3 mg/ml になるように加えた MEMα (選択培地) を加えてよく細胞を懸滴し、直径 1.0 cm のディッシュを用い、37℃、CO₂ インキュベーターにて 5 日間培養した。PBS で細胞を洗浄し、MEMα (選択培地) を加えて 5 日間培養した。同様の操作をして、さらに 5 日間培養した。PBS で細胞を洗浄した後、トリプシン処理し、1.0 ml の MEMα (選択培地) を加えて細胞を懸滴し、直径 6 cm のディッシュを用い、37℃、CO₂ インキュベーターにて 3

～7日間培養した。出現してきたコロニーをトリプシン処理した後、50 nMのMTXを含む10 mlのMEM α （選択培地）を用いて細胞濃度 $5 \times 10^4/\text{ml}$ になるように直径10 cmのディッシュ1枚に植え込んだ。5日おきに上記培地を用いて培地の交換を計3回行った。出現してきたMTX耐性のコロニーを單コロニー分離し、各々直径8 cmのディッシュを用い、コンフルエントになるまで培養した。5 mlの50 nM MTXを含むMEM α （選択培地）に交換し、1日後培養液中のUK-S1の活性をフィブリン・プレート・アッセイ法 (Granelli-PipernoとReich: ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン (J. Exp. Med.) 148, 233 (1978)) を用いて調べた。その結果、クローン数12の活性が最も高く、そのUK-S1の生産量は5 $\mu\text{g}/10^6\text{細胞}\cdot\text{日}$ であった。このクローンを100 mlの50 nM MTXを含むMEM α （選択培地）を含むファルコン (Falcon) 3027型ローラー・ボトルで培養し、コンフルエントになった後、

FCSを除去した10 KIU/mlアプロチニン（ベーリンガー・マンハイム社）を含む上記培地を用い、3日間培養した。この100 mlの培養液は実施例8で用いた。

④ pSE1UKpro1-1Aを保有する動物細胞によるpro-UKポリペプチドの生産：

参考例13で得られた組換え体プラスミドpSE1UKpro1-1AとpSV2-dhfrおよびdhfr欠損CHO細胞株を用いて、上で述べた手順と同様の手順でpro-UKを生産する細胞株を得た。この中でクローンNo.5の活性が最も高く、そのpro-UKの生産量は3 $\mu\text{g}/10^6\text{細胞}\cdot\text{日}$ であった。このクローンを、100 mlの50 nM MTXを含むMEM α （選択培地）を含むファルコン3027型ローラー・ボトルで培養し、コンフルエントになった後、FCSを除去した10 KIU/mlアプロチニン（ベーリンガー・マンハイム社）を含む上記培地を用い、3日間培養した。この100 mlの培養液は実施例8で用いた。

実施例8.

天然型pro-UKと組組付加型修飾UK-S1のトロンビンに対する感受性の比較：

(ii) pro-UKとUK-S1のCHO細胞培養液からの精製：

実施例7で得た天然型のpro-UKあるいは組組付加型修飾UK-S1を含有する細胞濃度培養液それぞれ100 mlに対して0.05%フィーン (Tween) 80と0.05%Na₂N₃を含む50 mMリン酸緩衝液 (pH 7.5) (以下PBS-TAと略す) で平衡化した5 mlのジンク (Zn) -キレート-セファロース (Sephadose) [ファルマシア・ジャパン株式会社 (Pharmacia Fine Chemicals) 製] を添加し、4℃で1時間以上程やかに混合した。この混合液をミニカラム (生化学工業社製 セバコール・ミニ) に充填した。カラムを10ベッド体積のPBS-TAで洗浄した後、3ベッド体積の500 mM NaClを含むPBS-TAで溶出した。

各カラムを10ベッド体積の10 KIU/mlアプロチニンを含むPBS-TAで洗浄した後、10 KIU/mlアプロチニンと50 mMイミダゾール (imidazole) を含むPBS-TAで溶出を行

った。この溶出液について上述のフィブリン・プレート・アッセイ法によりウロキナーゼ蛋白質の有無を調べ、ウロキナーゼ蛋白質を含む部分を集めめた。この溶液に対して、PBS-TAで平衡化した5 mlのSP-セファデックス (Sephadex) C50 [ファルマシア・ジャパン株式会社 (Pharmacia Fine Chemicals) 製] を添加し、4℃で1時間以上程やかに混合した。この混合液をミニカラム (生化学工業社製 セバコール・ミニ) に充填した。カラムを10ベッド体積のPBS-TAで洗浄した後、3ベッド体積の500 mM NaClを含むPBS-TAで溶出した。

次に、直ちにこの溶出液に対して、PBS-TAで平衡化した1 mlのベンザミジン (Benzamidine)-セファロース (Sephadose) 6 B (ファルマシア・ジャパン株式会社製) を添加し、4℃で1時間以上、程やかに混合した。この混合液をミニカラム (生化学工業社製 セバコールミニ) につめ、素通り部分を集めめた。この素通り部分

には、1本鎖の天然型 pro-UKあるいは1本鎖のUK-S1が含まれていた。

UK-S1に新たなN-グリコシド結合型糖鎖が付加していることは、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて天然型 pro-UKとUK-S1を解析したときに、UK-S1の方が天然型 pro-UKよりも分子量が大きいこと、および天然型 pro-UKとUK-S1をN-グリカナーゼで処理することにより、両者の分子量が減少しほぼ同一になることにより確認した。

四 構製した天然型 pro-UKおよびUK-S1のトロンビン感受性テスト：

上で得られた天然型 pro-UKおよびUK-S1を含む溶液をフィブリン・プレート・アッセイ法を用いてウロキナーゼ活性として1000 IU/mlとなるように300 mM NaClを含むPBS-TAで希釈した。この希釈液2.16 mlに24 μMヒト・トロンビンを3.6 μl添加し、37°Cに保温した。ヒト・トロンビンはシグマ

(Sigma)社製のものを用いた。また、ヒト・トロンビンは298 IUのトロンビンに対して100 IUのアプロチニンを加え、37°Cで一時間反応させた標品を用いた。トロンビンを添加した後、15、30、60、120分後に63 μlずつサンプリングし、24 μMのトロンビン阻害剤(Thromstop・American Diagnostica社製)を9 μl加え、反応を停止させた。また、トロンビン添加後、直ちにトロンビン阻害剤を加えたサンプルも調製した(これをトロンビン添加後0分のサンプルとした)。また、対照群としてトロンビンを添加していないものを37°Cで保温した。

次に、各試料2.25 mlをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 [レムリ (Laemmli): ネイティマー (Nature) 227, 680 (1970)] に供することにより、1本鎖のウロキナーゼ(調導体)が2本鎖になったかどうか調べた。その結果、天然型 pro-UKに比べてUK-S1の方が2本鎖になる割合が少ないことが判明した(第

12図参照)。この結果はUK-S1の方がトロンビンに対する感受性が低いことを示す。

さらに、この結果を確認するため、S-2444アミドリティック (amidolytic) 活性の測定を行った。すなわち、上記の試料をTNT緩衝液 [0.5 M Tris-HCl (pH 7.4)、0.38 M NaCl、0.1% Tween 80] で5倍希釈したもの50 μlに、10 μMヒト・プラスミン (Plasmin)を50 μl加え、37°Cで30分間反応させた。ヒト・プラスミンはペーリンガー・マンハイム社製のものを用いた。次に、発色性基質S-2444 [1.2 mM; カビ (Kabi Vitrum) 社製]を50 μl添加し、さらに37°Cで90分間反応させた後、405 nmの吸光度を測定し、アミドリティック活性を算出した。その結果を第13図に示す。

第13図に示したように、UK-S1は天然型 pro-UKに比べ、トロンビンに対する感受性が低いことが判明した。

実施例9.

天然型 pro-UKと糖鎖付加型修飾UK-S1の *in vivo* 評価：

(1) 持続注入 (infusion) による実験：

生後4～6ヶ月の雄ビーグル犬(体重5.5～11.5 kg)を用いた。3.9 mg/kgのペントバルビタールナトリウムの静脈内投与により麻酔し、室内空気による人工呼吸を施した。実施例8-(1)の方法で得た天然型 pro-UKおよび糖鎖付加型修飾UK-S1を大脚静脈より30分間 (2000 U/kg/分) 持続注入し、投与前(0分)、投与開始後15、30、45、60、90分の各時点において大脚動脈より採血した。採血した血液は直ちに遠心分離して血漿を得、測定まで-20°Cで凍結保存した。得られた血漿を用い、実施例9-1-1に用い、全身凝溶系因子の測定を行った。その結果、糖鎖付加型修飾UK-S1は天然型 pro-UKと同様にはほとんど全身凝溶系因子を活性化しないことがわかった(第45図参照)。また、ウロキナーゼに

に対する抗体を用いたサンドイッチ型の酵素免疫測定法により、天然型 pro-UK および糖鎖付加型修飾 UK-S1 の血漿中濃度の測定を行ったところ、天然型 pro-UK の血漿中からの消失半減期が 12.0 分であったのに対し、糖鎖付加型修飾 UK-S1 では 24.2 分であり、消失半減期の延長が認められた。また、このときの血漿中濃度一時間曲線下面積 (AUC) については糖鎖付加型修飾 UK-S1 の AUC は天然型 pro-UK の AUC の約 3.6 倍であった〔第 8 表- (A) 参照〕。

(2) 急速静注 (bolus) 投与による実験：

雌性の雄性犬 (体重 4.6 ~ 13.0 kg) を用いた。上と同様にして準備した犬の大腸動脈を約 5 cm にわたって露出し、その最も中枢に近い所で電磁血流計を装着した。分枝を含む動脈の一部 (約 1 cm) の前後を結紮して血流のない小部分を作り、分枝から 1000 U/mg のトロンビン (ミドリ十字) を 0.2 ~ 0.4 mg 注入してこの部分に血栓を作製した。血栓生成の有無は血流

糖鎖付加型修飾 UK-S1 では 48.1 分であり、消失半減期の延長が認められた。さらにこのときの AUC は天然型 pro-UK の約 5.6 倍であった〔第 8 表- (B) 参照〕。

(3) 全身凝溶系因子への影響の検討：

全身凝溶系因子として、 α 2-プラスミンインヒビター、プラスミノーゲン、フィブリノーゲンの 3 項目について測定を行った。

すべての項目の被検血漿は、全血液 9 容に 3.8% タエン酸 1 容を加えたものを 3000 回転/分で 10 分間遠心した上清として得た。これに加えて、 α 2-プラスミン インヒビター、プラスミノーゲン測定用血漿には最終濃度 12.5 μ M の OPPACK (0-phenyl alanyl-L-prolyl-L-arginine chloromethyl ketone, CALBIOCHEM®, Lot#586042, Hoechst) を、またフィブリノーゲン測定用血漿には 250 U/mg のアプロテニン (トラジロール®, バイエル) を添加した。

測定はオリンパス社製、オートアナライザ AUS 10 を用いた。試薬は α 2-プラスミン

量の増減によって判断した。血栓生成後、最低 1 時間 (1 ~ 1.5 時間) 放置し、自然溶解が起こらないことを確認した。天然型 pro-UK および糖鎖付加型修飾 UK-S1 (0.8 mg/kg) は 3 分間の急速静注とし、投与前 (0 分)、投与開始後 15, 30, 45, 60, 90, 120 分の各時点において採血した。

その結果、天然型 pro-UK では四頭の 2 例について血栓の再開通が認められなかったのに対し、糖鎖付加型修飾 UK-S1 を投与した犬 3 例全てに再開通が認められた。このときの全身凝溶系因子の測定を行ったところ、天然型 pro-UK では全身凝溶系因子の活性化傾向が見られたのに対し、糖鎖付加型修飾 UK-S1 では、infusion の場合と同様に全身凝溶系因子の活性化は認められなかった (第 4-6 図参照)。

また同時に、天然型 pro-UK および糖鎖付加型修飾 UK-S1 の血漿中濃度の測定を行ったところ、天然型 pro-UK の血漿中からの消失半減期が 30.3 分であったのに対し、糖

インヒビター、プラスミノーゲンの定量には三共の ALP オートカラー三共をそれぞれ用い、フィブリノーゲンの定量には国際試薬のフィブリノーゲン試薬を用いた。

第 8 表

天然型 pro-UK および糖鎖付加型修飾 UK-S1 の血中半減期

(A) 持続注入 (ビーグル犬)

	T1/2(min)	AUC(μ g · min/mg)
pro-UK	12.0 ± 1.9	60.2 ± 13.4
UK-S1	24.2 ± 10.0	214 ± 57.6

(B) 急速静注 (雄犬)

	T1/2(min)	AUC(μ g · min/mg)
pro-UK	30.3 ± 8.9	98.8 ± 38.1
UK-S1	48.1 ± 2.0	555 ± 118

実験例 10.

糖鎖付加型修飾 UK-S3 をコードする組換えプラスミド pUKS3 の造成：

特開平2-227075 (35)

実施例6の(2)-(C)で得られたpUKS1プラスミドDNA約2μgを3.0μgのY-100緩衝液に溶かし、1.6単位のCfrIと1.0単位のHindIIIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、1.0分間の熱処理後、ATP法を用いて約0.75KbのDNA断片を精製した。一方、参考例20で得られたpHPA2プラスミドDNA約2μgを3.0μgのY-100緩衝液に溶かし、1.0単位のHindIIIと1単位のEcoRIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、1.0分間の熱処理後、ATP法を用いて約3.4KbのDNA断片を精製した。下記2種の合成DNA(4.3塩基と4.3塩基)を実施例1に述べた方法に従い、合成および5'末端のリン酸化を行った。

5'-GGC CAA AAG ACT ATT CGA ACG CGT TTT AAG ATT ATT GGG GGA G- 3'
3'- TT TTC TGA TAA GCT TGC GCA AAA TTC TAA TAA CCC CCT CTT AA-5'
このようにして得られたpUKS1由来の約0.75KbのDNA断片(約0.1μg)、pHPA2由来の約3.4KbのDNA断片(約0.1μg)、

2時間消化反応を行った。続いて1.5μgの2M NaClと1.0単位のXbaIを加え、さらに37℃で1時間消化反応を行った。65℃、1.0分間の熱処理後、AFT法を用いて約8.8KbのDNA断片を精製した。また、pSE1UKpro1-1AプラスミドDNA約3μgを3.0μgのY-100緩衝液に溶かし、1.2単位のBglIIと1.2単位のXbaIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、1.0分間の熱処理後、AFT法を用いて約0.75KbのDNA断片を精製した。一方、上で得られたpUKS3プラスミドDNA約3μgを3.0μgのY-0緩衝液に溶かし、1.5単位のKpnIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。続いて1.5μgの2M NaClと1.2単位のBglIIを加え、さらに37℃で1時間消化反応を行った。65℃、1.0分間の熱処理後、AFT法を用いて約1.15KbのDNA断片を精製した。このようにして得られたpSE1PA1S81dhfr1-9A由来の約8.6KbのDNA断片(約0.1μg)、

および5'リン酸化された2種の合成DNA(1ピコモルずつ)を全量2.0μgのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、3.00単位のT4リガーゼを加え、4℃で1.8時間結合反応を行った。得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を尼質転換し、Ap耐性を尋た。この尼質転換株からプラスミドDNAを単離し、制限酵素消化による構造解析およびM13ディオキシ・シーケンス法による塩基配列決定を行い、目的の構造を有し、Leu153→Asn、Pro155→Thrの塩基置換を持つプラスミドDNAをpSEUKS3と命名した(第47図参照)。本発明で得られたUK-S3のアミノ酸配列を第7表に示す。

実施例11.

UK-S3発現プラスミドpSEUKS3の合成:

参考例9で得られたpSE1PA1S81dhfr1-9AプラスミドDNA約2μgを3.0μgのY-0緩衝液に溶かし、1.0単位のKpnIを加え、37℃で

pSE1UKpro1-1A由来の約0.75KbのDNA断片(約0.02μg)、およびpUKS3由来の約1.15KbのDNA断片(約0.02μg)を全量2.0μgのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、1.00単位のT4DNAリガーゼを加え、4℃で1.8時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を尼質転換し、Ap耐性株を得た。この尼質転換株からプラスミドDNA、pSEUKS3を単離し、制限酵素消化による構造解析を行ったところ、pSEUKS3は目的の構造を有することを確認した(第48図参照)。

プラスミドpSEUKS3を含む大腸菌菌株はEscherichia coli BSEUKS3 (FERM BP-2478)として1989年8月15日付で微生物研にブダベスト協約のもとに寄託してある。

実施例12.

pSEUKS3を保有する動物細胞によるUK-S3ポリペプチドの生産:

実施例1-1で得られた組換え体プラスミドpSEUKS3およびd'hfr欠損CHO細胞株を用いて、上で述べた手順と同様の手順でUK-S3を生産する細胞株を得た。この中でクローン13の活性が最も高く、そのUK-S3の生産量は3mg/10⁶細胞・日であった。このクローンを、100mlの50nM MTXを含むMEM^a（選択培地）を含むファルコン3027型ローラー・ボトルで培養し、コンフルエントになった後、FCSを除去した10ml/瓶アプロテニン（ペーリング・マンハイム社）を含む上記培地を用い、3日間培養した。この100mlの培養液は実施例1-3で用いた。

実施例1-3.

細胞付加型修飾UK-S3の熱安定性に対する検討：

実施例8-10と同様にしてCHO細胞培養液から細胞付加型修飾UK-S3を精製した。精製された天然型p_{ro}-UKおよび細胞付加型

修飾UK-S3を50mMリン酸、200mMアルギニン、100mM NaCl、0.01%Tween80、0.05%アグ化ナトリウムから成る緩衝液（pH7.5）に10mg/mlになるよう溶解し、70℃でインキュベートした。インキュベート開始後、1、2、3、4時間毎にサンプリングを行い、水中で冷却後直ちにフィブリン・プレート・アッセイを行い、残存活性を測定した（第49図参照）。

細胞付加型修飾UK-S3は天然型p_{ro}-UKよりも熱に対して安定であることが明らかとなつた。

参考例1.

ヒトt-PAcDNAを運ぶプラスミドp_{ro}PTの造成：

(1) Detroit562細胞よりのボリ(A) RNAの調製：
ヒト喉頭ガン細胞株Detroit562より、オシアン酸グアニジン塩化リチウム法（カサラ（Catala）ら：ディーエスエイ（DNA）2, 329(1983)）に従い、ボリ(A)を有するRNAを下記のごとく調製した。

ヒト喉頭ガンDetroit562（ピーターソン・ダブリュ・ディ・ジュニア（Peterson, W. D., Jr.）ら：プロシーディングス・オブ・ザ・ソサイアティ・オブ・エクスペリメンタル・バイオロジー・アンド・メディシン（Proc. Soc. Exp. Biol. Med.）136, 1187(1971)）を、10%仔牛胎児血清、100×非必須アミノ酸液（Plow Laboratories社製）を1/100量、1mMビルビン酸ナトリウム、0.1%ラタトアルブミン水化物（ギブコ・オリエンタル）を含む50mlのMEM培地（日本製薬社製）を用い、ティッシュ・カルチャー・プラス

コ（コーニング社製、150cm²）内で生育させた。37℃でコンフルエント（confluent）になるまで培養した後、細胞をPBSで洗浄し、100ng/mlのフォルボル・ミリステート・アセテート（PMA: Phorbol myristate acetate）を添加し、仔牛胎児血清を除いた上記培地30mlを加え、さらに37℃で24時間培養した。続いて細胞を0.05%トリプシン、0.02%EDTAを含む培液10mlで処理し、細胞懸濁液を得た。6本の上記ティッシュ・カルチャー・プラスコから総計1×10⁸の細胞を得た。細胞懸濁液から、1,100×g、4℃、10分間の遠心によって細胞を認め、80mlのリン酸塩バッファーで洗浄した後、5Mオシアン酸グアニジン、10mM EDTA、50mM Tris-HCl（pH7）および8%（V/V）2-メルカプトエタノールからなる液10ml中でボルテックス・ミキサーを用い可溶化した。この可溶化液を遠心管に移し、4M LiCl液80mlを加えて混ぜた後、4℃で20時間静置した。Hitachi RPR10ローラーにて9,000rpm、90分

離心後、RNAを沈殿として回収した。RNAの沈殿を4M尿素および2M塩化リチウムからなる溶液50mlに懸滴し、Hitachi RPR10ローターにて9,000rpm、60分間離心後、再びRNAを沈殿として回収した。RNAの沈殿を0.1%ラウリル硫酸ナトリウム、1mM EDTA、10mM Tris-HCl (pH7.5) からなる溶液10mlに溶解し、フェノール-クロロホルムで抽出後、エタノール沈殿により回収した。得られたRNA約2.5mgを10mM Tris-HCl (pH8.0) および1mM EDTAからなる溶液1mlに溶かした。65°C、5分間インキュベートし、0.1mlの5M NaClを加えた。混合物をオリゴ(dT)セルロース・カラム〔ビー・エル・バイオケミカル (P-L Biochemical) 社製〕クロマトグラフィー (カラム体積0.5ml)にかけた。吸着したボリ(A)を有するmRNAを10mM Tris-HCl (pH7.5) および1mM EDTAからなる溶液で溶出し、ボリ(A)を有するmRNA約9.0μgを得た。

四 cDNA合成と該DNAのベクターへの挿入：

mmとなるよう加えた溶液200μlに加え、さらに81単位のターミナルデオキシヌクレオチジルトランスクレーベ (以下TdTと略記する) (P-L Biochemicals社製)を加えて、37°C、11分間反応させた。ここで、pCDV1のKpnI切断部位の3'末端にボリ(dT)鎖が約67個付加された。該溶液からフェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈殿により、ボリ(dT)鎖の付加したpCDV1DNA約100μgを回収した。該DNAを10mM Tris-HCl (pH7.5)、6mM MgCl₂、100mM NaClからなる緩衝液150μlに加え、さらに360単位のEcoRIを加え、37°C 2時間反応させた。該反応液をLGT法で処理後、約3.1kbのDNA断片を回収し、約60μgのボリ(dT)鎖付加pCDV1を得た。該DNAを10mM Tris-HCl (pH8.0) および1mM EDTAからなる溶液500μlに溶解し、85°C 5分間インキュベート後、水冷して50μlの5M NaClを加えた。混合物をオリゴ(dA)セルロースカラム (コラボレイティブリザーチ社製)クロマトグラフィーにかけた。ボリ

オカヤマーバーグ (Okayama-Berg) の方法 [モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジイ (Mol. Cell. Biol.)、2, 181 (1982)] に従い、cDNAの合成とそれを組み込んだ組換え体プラスミドの構成を行った。その工程の略図を第14図に示す。

pCDV1 [オカヤマ・アンド・バーグ (Okayama & Berg) : モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジイ (Mol. Cell. Biol.)、3, 280 (1983)] 400μgを10mM Tris-HCl (pH7.5)、6mM MgCl₂、および10mM NaClからなる溶液300μlに加え、さらに500単位のKpnIを加えて、37°C、6時間反応させ、プラスミド中のKpnI部位で切断した。フェノール-クロロホルム抽出後、エタノール沈殿によりDNAを回収した。KpnI切断した該DNA約200μgを40mMカコジル酸ナトリウム、30mM Tris-HCl (pH8.8)、1mM CaCl₂、および0.1mMジチオスレイトール (以下DTTと略記する) からなる緩衝液 (以下TdT緩衝液と略記する) にdTTPを0.25

(dT) 鎖長が充分なものはカラムに吸着し、これを10mM Tris-HCl (pH8.0) および1mM EDTAからなる溶液で溶出し、ボリ(dT)鎖の付加したpCDV1 (以下ベクターブライマーと略記する) 27μgを得た。

次にリンクーDNAの調製を行った。

pL1 [オカヤマ・アンド・バーグ (Okayama & Berg) : モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジイ (Mol. Cell. Biol.)、3, 280 (1983)] 約14μgを10mM Tris-HCl (pH7.5)、6mM MgCl₂、および50mM NaClからなる緩衝液200μlに加え、さらに50単位のPstIを加え、37°C 4時間反応させ、pL1DNA中のPstI部位で切断させた。該反応物をフェノール-クロロホルム抽出後、エタノール沈殿を行い、PstIで切断したpL1DNA約13μgを回収した。該DNA約13μgをTdT緩衝液に濃度0.25mMのdGTPを含む溶液50μlに加え、さらにTdT (P-L Biochemicals社製) 54単位を加えて37°C 13分間インキュベートし、pL1のPstI切断部位3'末

端に(dG)端を約14個付加した。フェノールークロロホルム抽出後エタノール沈澱にてDNAを回収した。該DNA 10mM Tris-HCl (pH7.5)、6mM MgCl₂、および60mM NaClからなる緩衝液 100μlに加え、さらに80単位のHindIIIを加えて37℃ 3時間インキュベートし、pL10RNAのHindIII部位で切断した。該反応物をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約0.5kbのDNA断片をDEAEペーパー法 [ドレツェン(Dretzen)ら: アナリティカル・バイオケミストリイ (Anal. Biochem.)、112、295(1981)] にて回収し、オリゴ(dG)端付きのリンクーDNA(以下単にリンクーDNAと略記する)を得た。

上記で調製したボリ(A)RNA約4μg、ベクタープライマー約1.4μgを50mM Tris-HCl (pH8.3)、8mM MgCl₂、30mM KCl、0.3mM DTT、2mM dNTP (dATP, dTTP, dGTP およびdTTP) および10単位のリボヌクレアーゼインヒビター (P-L Biochemicals 社製) からなる溶液22.3μlに溶解し、10単位の逆転写酵素

(生化学工業社製)を加え、41℃ 30分間インキュベートし、mRNAに相補的なcDNAを合成させた。該反応物をフェノールークロロホルム抽出、エタノール沈澱を行い、RNA-DNA二重鎖の付加したベクタープライマー-DNAを回収した。該DNAを66μM dCTPおよび0.2μgボリ(A)を含むTdT緩衝液20μlに溶解し、14単位のTdT (P-L Biochemicals 社製)を加えて37℃ 2時間インキュベートし、cDNA 3'末端に20個の(dC)端を付加した。該反応物をフェノールークロロホルム抽出し、エタノール沈澱により(dC)端の付加したcDNA-ベクタープライマー-DNAを回収した。該DNAを10mM Tris-HCl (pH7.5)、6mM MgCl₂、および60mM NaClからなる緩衝液400μlに溶解し、20単位のHindIIIを加え、37℃ 2時間インキュベートし、HindIII部位で切断した。該反応物をフェノールークロロホルム抽出、エタノール沈澱して0.5ピコモルの(dC)端付加cDNA-ベクタープライマー-DNAを得た。該DNA 0.2

ピコモルおよび前記のリンクーDNA 0.4ピコモルを10mM Tris-HCl (pH7.5)、0.1M NaClおよび1mM EDTAからなる緩衝液100μlに溶解し、65℃、42℃、0℃でそれぞれ10分、25分、30分間インキュベートした。20mM Tris-HCl (pH7.5)、4mM MgCl₂、10mM (NH₄)₂SO₄、0.1M KClおよび0.1mM β-NADの組成で、全量1000μlとなるよう反応液を調製した。該反応液に25単位の大腸菌DNAリガーゼ(ニューアイギングランド・バイオラブズ社製)を加え、11℃ 18時間インキュベートした。該反応液を各40μMのdNTP、0.15mM β-NADとなるよう成分を追加調製し、10単位の大腸菌DNAリガーゼ、20単位の大腸菌DNAポリメラーゼI (P-L Biochemicals 社製)、および10単位の大腸菌リボヌクレアーゼH (P-L Biochemicals 社製)を加え、12℃、25℃で順次1時間ずつインキュベートした。上記反応で、cDNAを含む組換えDNAの環状化と、RNA-DNA二重鎖のRNA部分がDNAに置換され、完全な二重鎖

DNAの組換え体プラスミドが生成した。

3. ヒトt-PA・cDNAを含む組換えDNAの選択:

次に、コロニー・ハイブリダイゼーションを用い、ヒトt-PA・cDNA [ペニカ(Pennica)ら: ネイチャー (Nature) 301, 214(1983)] のt-PAシグナルペプチド領域の一部の塩基配列と一致する塩基の合成DNA
5'-ATGGATGCAATGAAAGAGAGGGCTCTGCTGT-3'を³²Pで標識したプローブと会合するクローンとして、t-PA・cDNAを以下のようにして選択した。

まず、3で得た組換え体プラスミドを用い、大腸菌C 800 S P 8株 [カameron(Cameron) : プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 72, 3416(1975)] をハナハノの方法 [Hanahao: ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.)、168、557(1983)] に従い毛質転換した。られた約

10,000個のコロニーをハナハンとメセルソンの方法 [Hanahan and Meselson: メソッド・イン・エンザイモロジー (Method in Enzymology) 100, 333(1983)] に従い、ニトロセルロース・フィルター上に固定した。次に、フィルターのプレハイブリダイゼーションは、 $6 \times NET$ ($1 \times NBT=150mM\ NaCl$ 、 $15mM\ Tris-HCl$ (pH7.5)、 $1mM\ EDTA$)、 $10 \times$ デンハルト (Denhardt) 液、および $100\mu g/ml$ の断片化した大腸菌染色体DNAを含む溶液中、 $65^{\circ}C$ 、4時間またはそれ以上の時間行った。このプレハイブリダイゼーション溶液に上述の ^{32}P で標識したプローブを加え、フィルター上のDNAと会合させた ($65^{\circ}C$ 、16時間以上)。次に、フィルターを $6 \times SSC$ ($1 \times SSC=150mM\ NaCl$ 、 $15mM$ クエン酸ナトリウム) で2回洗浄し (室温、5分間ずつ)、 $65^{\circ}C$ の $2 \times SSC$ と 0.1% SDS を含む液で30分間洗浄した。さらに $65^{\circ}C$ の $2 \times SSC$ と 0.1% SDS を含む液で15分間洗浄した後、 $6 \times SSC$ で室温で2回洗浄した (5分間ずつ)。

参考例1で作成したDetroit 562細胞のcDNAライブラリーをコロニー・ハイブリダイゼーション法によりスクリーニングし、ヒトpro-UK cDNAクローンを単離した。すなわち、まず、参考例1で得た組換え体プラスミドを用い、大腸菌C6000SP8株 [カameron (Cameron) : プロセーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA 72, 3416(1975)] をハナハンの方法 [Hanahan: ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.)、186, 557 (1983)] に従い形質転換した。得られた約30,000個のコロニーをハナハンとメセルソンの方法 [Hanahan and Meselson: メソッド・イン・エンザイモロジー (Method in Enzymology) 100, 333(1983)] に従い、ニトロセルロース・フィルター上に固定した。次に、フィルターのプレハイブリダイゼーションは、 $6 \times NET$ 、 $10 \times$ デンハルト (Denhardt) 液、および $100\mu g/ml$ の断片化した大腸菌染色体DNAを含む溶液中、

5分間ずつ)。フィルターを空気乾燥した後、オートラジオグラフィーにより属性クローン1個を同定した。この属性クローンが持つプラスミド $\rho tPA7$ のcDNAの塩基配列を、M13プライヤーを用いたディアオキシ・シーケンス法により決定した。その結果、 $\rho tPA7$ のcDNAは、ペニカラが報告した $t-PA$ のアミノ酸配列 [Penicaら: ネイチャー (Nature) 301, 214(1983)] と完全に一致する $t-PA$ をコードしていることが判明した。ただし、成熟型 $t-PA$ の95番目のアスパラギン酸のコドン (GAC) と 512番目のスレオニンのコドン (ACA) がそれぞれGAT、ACCになっていることがわかった。

この菌株は、Escherichia coli E $\rho tPA7$ FERM BP-1467として、微生物研究所に寄託されている。

参考例2.

ヒトpro-UK cDNAを運ぶプラスミド $\rho UK1$ の造成:

$65^{\circ}C$ 、4時間またはそれ以上の時間行った。

次に、ヒトpro-UK cDNA [ホルムズ (Holmes) ら: バイオテクノロジー (Bio/Technology) 3, 923(1985)] のクリングル領域の一部の塩基配列と一致する41塩基の合成DNA

5'-GGGAATGGTCACCTTTACCGAGGAAAGGCCAGCACTGACAC-3'

(本発明者らが単離したヒトpro-UK cDNAについていえば、第5表中の下線を付した塩基配列に相当する) を ^{32}P で標識したプローブを、上のプレハイブリダイゼーション溶液に加え、フィルター上のDNAと会合させた ($65^{\circ}C$ 、16時間以上)。次に、フィルターを $6 \times SSC$ で2回洗浄した (室温、5分間ずつ) 後、 $1 \times SSC$ と 0.1% SDS を含む $57^{\circ}C$ の液で30分間洗浄した。さらに $1 \times SSC$ と 0.1% SDS を含む $57^{\circ}C$ の液で15分間洗浄した後、 $6 \times SSC$ で2回洗浄した (室温、5分間ずつ)。フィルターを空気乾燥した後、オートラジオグラフィーにより属性クローン1個を同定した。この属性クローンが持つプラスミド $\rho UK1$ のcDNA

の塩基配列を、M13ファージを用いたディオキシ・シーケンス法により決定した(第5表)。その結果、pUK1のcDNAは第5表のpro-UKのアミノ酸残基の番号付けに従った場合、pro-UKの41番目のCysの残基より下流のpro-UKの翻訳領域および3'非翻訳領域をコードしていることが明らかになった。pUK1のcDNAがコードしているpro-UKのアミノ酸配列は、ホルムズら[Holmesら:バイオテクノロジー(Bio/Technology)3, 923(1985)]の報告したものと一致していたが、以下に示す4つのアミノ酸のコドンの3番目の塩基が異なっていた。

254番目のアミノ酸Asn: AAC→AAT
340番目のアミノ酸Leu: CTA→CTG
345番目のアミノ酸Pro: CCC→CCA
346番目のアミノ酸Gln: CAA→CAG
この菌株は、Escherichia coli EUK1 FERM BP-1463として、微生物研究所に寄託されている。

参考例3.

65°C、10分間の熱処理後、AFT法を用い、約530bpのDNA断片を精製した。一方、ノルランダーラが造成したプラスミドpUC19 [Norraader, J. ら:ゲーン(Gene)26, 101(1983): pUC19プラスミドDNAは宝摺社より入手できる]約1μgを20mM KClを含むY-0緩衝液30μlに溶かし、16単位のSmaIを加え、30°Cで2時間消化反応を行った。65°C、10分間の熱処理後、AFT法を用い、約2.7kbのDNA断片を精製した。

このようにして得られたpRC19由来の約530bpのDNA断片(約0.01μg)とpUC19由来の約2.7kbのDNA断片(約0.05μg)とを20μlのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、200単位のT4DNAリガーゼを加え、4°Cで18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌JM294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNA、pCCK1を単離し、制限酵素による構造解析

ヒトpro-UKcDNAを運ぶプラスミドpUK11の造成:

参考例2で得られたプラスミドpUK1がコードしているpro-UKcDNAはpro-UKのシグナル領域と成長因子マトリキン領域を含んでいないので、以下に示す手順を用いて、これらの領域を含むcDNAのクローニングを行った。

まず、cDNAのクローニングに用いるベクターpCCK2の造成を以下のようにして行った。

(1) 組換えプラスミドpCCK1の造成:

桑野らが造成した、ラット脳コレクストキニン(CCK、神経体のcDNAを有するプラスミドpRC19[桑野ら:ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(J. Biochem.)96, 923-926(1984)]を持つ大腸菌HB101株を培養し、培養菌体から常法によりpRC19DNA約3μgを30μlのY-50緩衝液に溶かし、1単位のPvuIIを加え、37°Cで1時間消化反応を行った。この反応により、DNAはPvuIIにより部分的に消化された。

を行ったところ、目的の構造を有することを確認した(第15回参照)。

(2) 組換え体プラスミドpCCK2の造成:

上で得られたpCCK1プラスミドDNA約2μgを30μlのY-0緩衝液に溶かし、12単位のSacIを加え、37°Cで2時間消化反応を行った。さらに、1.5μgの2N NaClと10単位のBamHIを加え、37°Cで2時間消化反応を行った。65°C、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約0.55kbのDNA断片を精製した。一方、後述の参考例5で得られたpTrS33プラスミドDNA約2μgを上と同じ反応に供し、生じた約2.85kbのSacI-BamHI断片をAFT法を用いて精製した。

このようにして得られたpCCK1由来の約0.55kbのDNA断片(約0.02μg)とpTrS33由来の約2.85kbのDNA断片(約0.1μg)とを20μlのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、50単位のT4DNAリガーゼを加え、4°Cで18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌 MM294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドpDNApCCK2を単離し、制限酵素による構造解析を行ったところ、目的の構造を有することを確認した(第16回参照)。

(d) ヒトpro-UKc DNAを運ぶプラスミドpUK11の構造:

参考例1で調製したDetroit 562細胞のボリ(A) RNA(mRNA)約8μg(7μgの10mM Tris-HCl(pH7.5)-0.5mM EDTAに溶解されている)を85℃で10分間加熱した後、氷で冷却した。この溶液を、50mM Tris-HCl(pH8.3)、8mM MgCl₂、30mM KCl、5mM DTT、1mM dNTP(dATP、dTTP、dGTPおよびdCTP)、10単位のリボヌクレアーゼインヒビター(P-L Biochemicals社製)、および5μg/mlオリゴ(dT)₁₂₋₁₈(コラギレーティブ社製)(全量80μg)となるように調整した後、41℃で15分間保温した。次いで、20単位の逆転写酵素(生化学

ークロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った後、2.5mM NaClを含むY-0緩衝液30μlに溶かし、25単位のBssH II(ニューイングランドバイオラブズ社製)を加え、50℃で2時間消化反応を行った。さらに、1.25μlの2M NaClと12単位のBamH Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。85℃、10分間の加熱後、AFT法を用いて約1.1~1.4kbのcDNA断片を精製した。

一方、上で得られたpCCK2プラスミドDNA約2μgを上と同様にBssH IIとBamH Iで切断した後、AFT法を用いて約2.9kbのBssH II-BamH I断片を精製した。

このようにして得られた約1.1~1.4kbのcDNA断片(約0.02μg)とpCCK2由来の約2.9kbのDHA断片(約0.05μg)とを20μlのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、200単位のT4 DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換えプラスミド混合物を用いて、

工業社製)を加え、41℃で90分間保温し、mRNAに相補的なcDNAを合成した。該反応物をフェノールークロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った後、40μlの0.3M NaOHに溶かし、37℃に15時間放置することによって、mRNAを加水分解した。次に、10μlの1M Tris-HCl(pH7.5)と40μlの0.3M HClを加えて中和した後、1本鎖cDNAをエタノール沈殿によって回収し、28.5μlのH₂Oに溶解した。

この溶液を、50mM Tris-HCl(pH8.3)、8mM MgCl₂、30mM KCl、5mM DTT、1mM dNTP(dATP、dTTP、dGTPおよびdCTP)、および2.5μg/ml合成DNAプライマー-CATGAGAGCCCTGCTGG(ヒトpro-UKのシグナル・ペプチド領域の一部の塩基配列と一致する)(全量40μl)となるように調整した後、85℃で10分間、続いて41℃で30分間保温した。次いで10単位の逆転写酵素を加え、41℃で80分間保温することにより、1本鎖cDNAを2本鎖cDNAに変換した。該反応物をフェノール

ークロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った後、2.5mM NaClを含むY-0緩衝液30μlに溶かし、25単位のBssH II(ニューイングランドバイオラブズ社製)を加え、50℃で2時間消化反応を行った。さらに、1.25μlの2M NaClと12単位のBamH Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。85℃、10分間の加熱後、AFT法を用いて約1.1~1.4kbのcDNA断片を精製した。

一方、上で得られたpCCK2プラスミドDNA約2μgを上と同様にBssH IIとBamH Iで切断した後、AFT法を用いて約2.9kbのBssH II-BamH I断片を精製した。

このようにして得られた約1.1~1.4kbのcDNA断片(約0.02μg)とpCCK2由来の約2.9kbのDHA断片(約0.05μg)とを20μlのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、200単位のT4 DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換えプラスミド混合物を用いて、

hG-CSF cDNAを運ぶプラスミドpCS F1-2およびpCSP2の造成

(1) 正常人末梢血マクロファージからのポリ (A) RNAの調製：

正常人の末梢血より遠心分離して得た白血球をプラスチックボトルで培養し、非接着性の細胞を洗浄・除去することにより、接着性の細胞であるマクロファージを単離した。このマクロファージより、チオシアン酸グアニジン-塩化リチウム法〔カサラ(Catala)ら: ディーエヌエイ(DNA) 2, 329 (1983)〕に従い、ポリ(A)を有するRNAを下記のごとく調製した。

正常人の末梢血400mlをHitachi RPR10ローターにて1800rpm、20分間遠心して血球を沈殿させ、これを50mlリン酸緩衝食塩水(NaCl 8g/l, KCl 0.2g/l、無水Na₂HPO₄ 1.15g/l、KH₂PO₄ 0.2g/l (pH 7.2) : 以下PBSと略記する)に懸滴した。この懸滴液25mlをリンパ球分離液〔ビオネティクス(BIOBETICS)社製〕25mlに重層し、Hitachi RPR10ローターにて1800rpm、30分間遠心した。中間層の白血球を分

取し、等量のPBSで洗浄(Hitachi RPR10ローターにて1500rpm、10分間)した後、5%の仔牛胎児血清を含む20mlのRPMI 1640培地(日本製薬社製)に懸滴し培養した。培養には懸滴培養用フラスコ(コーニング社製)を用いた。37°Cで1.5時間培養した後、培養上清を非接着性の細胞とともに除去した。新たに20mlの同培地と大腸菌リポ多糖(LPS)を0.3mg/mlとなるように加え、さらに37°Cで4時間培養した。次いで、培養液より1,100×g、4°C、10分間の遠心によって細胞を集め、80mlのPBSで洗浄した後、5Mチオシアン酸グアニジン、10mM EDTA、50mM Tris-HCl (pH 7) および8% (v/v) 2-メルカプトエタノールからなる溶液10ml中でボルテックス・ミキサーを用い可溶化した。この可溶化物を遠心管に移し4M LiCl溶液80mlを加えて攪拌した後、4°C、20時間静置した。Hitachi RPR10ローターにて9,000rpm、90分間遠心後、RNAを沈殿として回収した。R

NAの沈殿を4M尿素および2M塩化リチウムからなる溶液50mlに懸滴し、Hitachi RPR10ローターにて9,000rpm、60分間遠心後、再びRNAを沈殿として回収した。

RNAの沈殿を0.1%ラウリル硫酸ナトリウム、1mM EDTA、10mM Tris-HCl (pH 7.5) からなる溶液10mlに溶解し、フェノール-クロロホルムで抽出後、エタノール沈殿により回収した。得られたRNA約0.8mgを10mM Tris-HCl (pH 8.0) および1mM EDTAからなる溶液1mlに溶かした。65°C、5分間インキュベートし、0.1mlの5M NaClを加えた。混合物をオリゴ(dT)セルロース・カラム〔ビー・エル・バイオケミカル(P-L Biochemical)社製〕クロマトグラフィー(カラム体積0.5ml)にかけた。吸着したポリ(A)を有するmRNAを10mM Tris-HCl (pH 7.5) および1mM EDTAからなる溶液で溶出し、ポリ(A)を有するmRNA約3.0mgを得た。

(2) cDNA合成と該cDNAのベクターへの挿入：

オカヤマーバーグ(Okayama-Berg)の方法〔モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.), 2, 161 (1982)〕に従い、cDNAの合成とそれを組み込んだ組換え体プラスミドの造成を行った。その工程の概略を第14図に示す。

上記で調製したポリ(A)RNA約3mg、ベクタープライマー約1.4μgを50mM Tris-HCl (pH 8.3), 8mM MgCl₂, 30mM KCl, 0.3mM DTT, 2mM dNTP (dATP, dTTP, dGTPおよびdTTP) および10単位のリボヌクレアーゼインヒビター(P-L Biochemicals社製)からなる溶液22.3mlに溶解し、10単位の逆転写酵素(生化学工業社製)を加え、41°C 90分間インキュベートし、mRNAに相補的なDNAを合成させた。該反応物をフェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、RNA-cDNA二重鎖の付加したベクタープライマー

DNAを回収した。該DNAを8.6 μM dC TTPおよび0.2 mMボリ(A)を含むTdT緩衝液20 mMに溶かし、14単位のTdT (P-L Biochemicals社製)を加えて37°C 2分間インキュベートし、cDNA 3'末端に約20個の(dC)塩を付加した。該反応物をフェノールークロロホルム抽出し、エタノール沈殿により(dC)塩の付加したcDNA-ベクタープライマー-DNAを回収した。該DNAを1.0 mM Tris-HCl (pH 7.5), 6 mM MgCl₂、および8.0 mM NaClからなる液400 μlに溶かし、20単位のHind IIIを加え、37°C 2時間インキュベートし、Hind III部位で切断した。該反応物をフェノールークロロホルム抽出、エタノール沈殿して0.5ピコモルの(dC)塩付加cDNA-ベクタープライマー-DNAを得た。該DNA 0.2ピコモルおよび前記のリンク-cDNA 0.4ピコモルを1.0 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 M NaClおよび1 mM EDTAからなる液100 μlに溶か

し、8.5°C, 42°C, 0°Cでそれぞれ10分、25分、30分間インキュベートした。2.0 mM Tris-HCl (pH 7.5), 4 mM MgCl₂, 1.0 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1 M KClおよび0.1 mM β -NADの組成で、全量1000 μlとなるよう反応液を調製した。該反応液に25単位の大腸菌DNAリガーゼ(ニューアイギングランド・バイオラブズ社製)を加え、11°C 18時間インキュベートした。該反応液を各40 μMのdNTP, 0.15 mM β -NADとなるよう成分を追加調製し、10単位の大腸菌DNAリガーゼ、20単位の大腸菌DNAポリメラーゼI (P-L Biochemicals社製)および1.0単位の大腸菌リボヌクレアーゼH (P-L Biochemicals社製)を加え、12°C, 25°Cで順次1時間ずつインキュベートした。上記反応で、cDNAを含む組換えDNAの環状化と、RNA-DNA二重鎖のRNA部分がDNAに置換され、完全な二重鎖DNAの組換え体プラスミドが生成した。

④ hG-CSF cDNAを含む組換えDNAの選択：

次で得られた組換え体プラスミドを用い、大腸菌C600-SF8株をスコット(Scott)らの方法(重複筛选；細胞工学_2, 816(1983))に従い選択実験した。得られた約9200個のコロニーをニトロセルロース・フィルター上に固定した。長田ら(長田(Nagata)ら: ネイチャー(Nature)319, 415(1986))が単離したhG-CSFの成熟タンパク質のN末端9アミノ酸に相当する27塩基の合成DNA
 5'-ACCCCCCTGGGCCCTGCCAGCTCCCTG-3'を³²Pで標識したプローブに80°Cで強く会合した2種株を選んだ(ゲルスティン・ホグネス(Gronstein-Hogness)の方法、プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミイ・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.) USA 72, 3961(1975))。これらの菌株がもつプラスミドpCSF1-2およびpCSF2が有するcDNAの全塩基配列を、M13ファージを用いたテ

ィオキシ・シーターンス法により決定した。その結果、pCSF1-2およびpCSF2が有するcDNAは、hG-CSFをコードしていることが判明した。プラスミドpCSF1-2を含む微生物は *Escherichia coli* ECSF1-2 [FERM BP-1220] として、またプラスミドpCSF2を含む微生物は *Escherichia coli* ECSF2 [FERM BP-2073] として微生物に寄託してある。

参考例5

組換え体プラスミドpTrS33の造成：

(1) ATGベクター-pTrS20の造成：

第18図に示した手順に従い、SD配列とATG開始コドンの間の距離が14塩基で、かつATGコドンの直後にSac Iサイトを有するATGベクター-pTrS20を造成した。

まず、特開昭58-110600号公報記載の方法で標識したpKYP10-3 μgをY-100緩衝液30 μlに溶かし、制限酵素Bam HIと制限酵素Nru I(ニューアイギングランド・バイオラ

ブズ社製)をそれぞれ6単位ずつ加え、37℃で3時間切断反応を行った。この反応液からLGT後によりP_{trp}を含む約3.8kbのDNA断片(BanIII-NruI断片)約0.5μgを得た。一方、P_{trp}の下流にATG開始コドンを付与するため下記のDNAリンクーをトリアステル法により合成した。



19-merと17-merの合成DNA(各々10ピコモルずつ)を50mM Tris-HCl(pH7.5)、10mM MgCl₂、5mMジオヌスレイトール、0.1mM EDTAおよび1mM ATPを含む全量20μlの溶液に溶かし、T4ポリヌクレオチドキナーゼ3単位(宝酒造社製)を加えて、37℃で60分間リソマラ化反応を行った。

次に上記で得たpKYP10由来のBanIII-NruI断片(約3.8kb)0.1μgと上記のDNAリンクー約0.5ピコモルをT4リガーゼ

液(各々20μl)に溶かし、さらにT4DNAリガーゼ2単位を加え、4℃で18時間結合反応を行った。

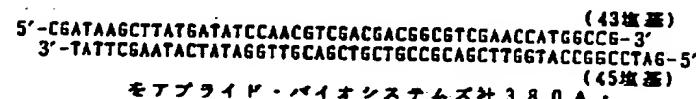
得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて大腸菌HB101株[オリバー(Oliver)ら:ジーン(Gene)2, 75(1977)]を選択培養し、Ap^rのコロニーを得た。このコロニーの培養液からプラスミドDNAを回収した。得られたプラスミドの構造は制限酵素EcoRI、BanIII、HindIII、SacI、NruIで切断後、アガロースゲル電気泳動により確認した。このプラスミドをpTrS20と名付けた(第18図)。pTrS20のBanIII、HindIIIサイト付近の塩基配列は下記のとおりであることをM13ファージを用いたディアオキシシーケンス法を用いて確認した。



② pTrS33の造成:

上で得られたpTrS20プラスミドDNA

を加え、37℃で2時間消化反応を行った。85℃、10分間の熱処理後、APF法により約0.65kbのDNA断片を精製した。これらとは別に、第19図に示す2種の合成DNA(43塩基と45塩基)



をアプライド・バイオシステムズ社380A-DNA合成器を用いて合成し、それぞれ別々に上に述べた方法と同じ方法を用いて5'リソマラ化した。

このようにして得られたpTrS20由来の約1.5kbのDNA断片(約0.1μg)、pKYP28由来の約1.7kbのDNA断片(約0.1μg)、M13mp18由来の約0.65kbのDNA断片(約0.05μg)、および5'リソマラ化された上記2種の合成DNA(それぞれ1pmoleずつ)を20μlのT4リガーゼ液(各々20μl)に溶かし、50単位のT4DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

このようにして得られた組換え体プラスミド

特開平2-227075 (45)

の混合物を用いて、大腸菌MM294株を毛質転換し、Ap耐性株を得た。この毛質転換株からプラスミドpTrS33を単離し、制限酵素消化による構造解析およびM13ファージを用いたディオキシ・シーケンス法により、pTrS33が目的の構造を有することを確認した(第19回参照)。

参考例6.

組換えプラスミドpTerm2の造成:

pKYP26プラスミドDNA(特開昭62-48699号公報)約2μgを10mM Tris-HCl(pH8.0)、75mM NaCl、7mM MgCl₂、8mM 2-メルカプトエタノールを含む溶液30μlに溶かし、18単位のAsp718(ペーリンガー・マンハイム社製)と10単位のPstIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、APT法を用いて約1.7kbのDNA断片を精製した。一方、参考例5の(1)で得られたpTrS20プラスミドDNA約2μgを30μlのY-100緩衝液に溶かし、8単位のPstIと10単位のNruI(ペーリンガー・

ことを確認した(第20回参照)。

参考例7.

組換え体プラスミドpTSF10の造成:

参考例1で得られたヒトt-PAC DNAを運ぶプラスミドpPAT7を持つ大腸菌C600SP8株の培養菌体から常法によりpPAT7 DNA約2μgをY-100緩衝液30μlに溶かし、制限酵素BglII 8単位を加え37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、APT法を用い、約2.0kbのDNA断片を精製した。次にpTrS33 DNA(参考例5)約2μgを30μlのY-100緩衝液中で10単位の制限酵素BamHIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、APT法を用い、約2.8kbのDNA断片を精製した。

このようにして得られたpPAT7由来の約2.0kbのDNA断片(約0.1μg)とpTrS33由来の約2.8kbのDNA断片(約0.1μg)を、全量20μlのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、T4 DNAリ

マンハイム社製)を加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、APT法を用いて約1.5kbのDNA断片を精製した。また、第20回に示す2種の合成DNA(19塩基と23塩基)をアプライド・バイオシステムズ社380A・DNA合成器を用いて合成し、それぞれを別々に上で述べた方法と同様の方法を用いて5'リジン酸化した。

このようにして得られたpKYP26由来の約1.7kbのDNA断片(約0.1μg)、pTrS20由来の約1.15kbのDNA断片および5'リジン酸化された2種の合成DNA(それぞれ1pmoleずつ)を20μlのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、50単位のT4 DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を毛質転換し、Ap耐性株を得た。この毛質転換株からプラスミドDNA、pTerm2を単離し、制限酵素消化による構造解析およびM13ファージを用いたディオキシ・シーケンス法により、pTerm2が目的の構造を有する

ガーゼ50単位を加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を毛質転換し、Ap耐性株を得た。この毛質転換株からプラスミドDNA、pTSF10を単離し、制限酵素消化による構造解析を行ったところ、目的の構造を有することを確認した(第21回参照)。

参考例8.

組換え体プラスミドpTA4の造成:

実施例7より得られたpTSF10プラスミドDNA約3μgをY-0緩衝液30μlに溶かし、12単位の制限酵素KpnIを加え、37℃で2時間消化反応を行った後、1.5μlの3MNaClと12単位の制限酵素BstEII(ニューイングランバイオラブス(New England Biolabs)社製)を加え、さらに80℃で2時間消化反応を行った。続いてAPT法を用い、約0.3kbのDNA断片を精製した。

これとは別に、大腸菌IGHA2(微研PRB)

BP-400)を培養し、培養細胞から常法によりpGHA 2プラスミドDNA (特開昭60-221091)を調製した。得られたpGHA 2 DNA約2μgを30μgのY-100種酵液に溶かし、8単位のPst Iと8単位のBgl IIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用い、約0.7-5kbのDNA断片を精製した。

また、pTPA7 DNA (参考例1)約3μgを3.0μgのY-150種酵液に溶かし、10単位のBgl IIを加え、37℃で2時間消化反応を行った後、12単位のBstE IIを加え、さらに60℃で2時間消化反応を行った。次いでAFT法を用い、約1.5-5kbのDNA断片を精製した。

また、参考例8で得られたpTerm2 DNA約2μgを30μgのY-0種酵液中で12単位のKpn Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った後、1.5μgの2M NaClと8単位のPst Iを加え、さらに37℃で2時間消化反応を行った。次いでAFT法を用い、約1.7kbのDNA断片を精製した。

オケミストリー (J. Biochem.) 101, 1307-1310 (1987)】を持つ大腸菌HB101株を培養し、培養細胞から常法によりpAGE28DNAを調製した。得られたpAGE28DNA約2μgを30μgのY-100種酵液に溶かし、8単位のXba Iと12単位のSac Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約2.8kbのDNA断片を精製した。一方、本発明者らによって造成されたプラスミドpAGE103 [水上ら: ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.) 101, 1307-1310 (1987)]を持つ大腸菌HB101株を培養し、培養細胞から常法によりpAGE103 DNAを調製した。得られたpAGE103 DNA約3μgを30μgのY-100種酵液に溶かし、10単位のEco RIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。フェノール抽出とクロロホルム抽出の後、エタノール沈澱によってDNA断片を回収した。このDNA断片を全量4.0μgのポリメラーゼ链酵液に溶かし、8単位のタレノー断片を加

精製した。

このようにして得られた4種類のDNA断片 (pTSF10由来の断片0.03μg、pGHA2由来の断片0.05μg、pTPA7由来の断片0.1μg、およびpTerm2由来の断片0.1μg)を20μgのT4リガーゼ链酵液に溶かし、200単位のT4 DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドpATA4を単離し、制限酵素消化による構造解析を行ったところ、目的の構造を有することを確認した (第22図参照)。

参考例9.

t-PA発現プラスミドpS81PA1S81dhfr1-9Aの造成:

(1) 組換え体プラスミドpAGE105Mの造成:

本発明者らによって造成されたプラスミドpAGE28 [水上ら: ジャーナル・オブ・バイ

オル・エコリ突出来端を平端出来端に変えた。反応をフェノール抽出によって止め、クロロホルム抽出を行った後、エタノール沈澱によってDNA断片を回収した。このDNA断片を30μgのY-100種酵液に溶かし、12単位のXba Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約0.4kbのDNA断片を精製した。また、O'Haraらによって造成されたプラスミドpKCR [O'Haraら: プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA 78, 1527 (1981)]を持つ大腸菌HB101株を培養し、培養細胞から常法によりpKCR-DNAを調製した。得られたpKCR-DNA約2μgを30μgのY-150種酵液に溶かし、12単位のBam HIと16単位のSac Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。フェノール抽出とクロロホルム抽出の後、エタノール沈澱によってDNA断片を回収した。

このDNA断片を全量40μgのポリメラーゼ链替液に溶かし、8'位のクレノー断片を加え、15℃で1時間反応させることにより、BamHI突出末端とSalI突出末端を平坦末端に変えた。85℃、10分間の熱処理の後、APTT法を用いて約1.85KbのDNA断片を精製した。

このようにして得られたpAGE28由来の約2.8KbのDNA断片(約0.05μg)、pA8B103由来の約0.4KbのDNA断片(約0.03μg)、およびpKCR由来の約1.85KbのDNA断片(約0.2μg)を20μgのT4リガーゼ链替液に溶かし、300単位のT4DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

このようにして得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、カナマイシン(以下、Kmと略記する)耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドpAGE105Mを単離し、制限酵素消化による構造解析を行ったところ、目的の構造を有することを確認した(第23図参照)。

(3) t-PA発現プラスミドpSE1PA1-5の造成:

上で得られたpAGE106DNA約2μgを30μgのY-0链替液に溶かし、12単位のKpnIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。さらに、L5Mの2M NaClと10単位のBamHIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、APTT法を用いて約5.0KbのDNA断片を精製した。一方、参考例1で得られたptPATプラスミドDNA約3μgを75mM NaClを含むY-0链替液30μgに溶かし、12単位のFokIと、12単位のEcoRIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、APTT法を用いて約0.7KbのDNA断片を精製した。また、第25図に示す2種の合成DNA(21塩基と21塩基)



をアプライド・バイオシステムズ社380A・DNA合成器を用いて合成し、それぞれ別々に実施例1で述べた方法と同様の方法を用いて5'リシン酸化した。

(4) 組換え体プラスミドpPAGE106の造成:

上で得られたpAGE105M・DNA約2μgを30μgのY-100链替液に溶かし、12単位のSalIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、APTT法を用いて約5.0KbのDNA断片を精製した。一方、実施例1と同様の方法で、5'リシン酸化されたEcoRIリンクマーを調製した。

このようにして得られたpAGE105M由来の約5.0KbのDNA断片(約0.1μg)と1ピコモルの5'リシン酸化されたEcoRIリンクマーを20μgのT4リガーゼ链替液に溶かし、100単位のT4DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、Km耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNApAGE106を単離し、制限酵素消化による構造解析を行ったところ、pAGE106は目的の構造を有することを確認した(第24図参照)。

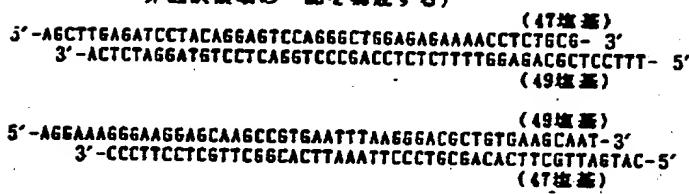
このようにして得られたpAGE106由来の約5.0KbのDNA断片(約0.1μg)とptPAT由来の約0.7KbのDNA断片(約0.1μg)、参考例8で調製されたpTAA4由来の約1.4KbのEcoRI-KpnI断片(約0.05μg)、および上で得られた5'リシン酸化された2種の合成DNA(それぞれ1pmoleずつ)を20μgのT4リガーゼ链替液に溶かし、50単位のT4DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、Km耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNApSE1PA1-5を単離し、制限酵素消化による構造解析およびM13ファージを用いたディオキシ・シータエンス法により、pSE1PA1-5が目的の構造を有することを確認した(第25図参照)。

(5) t-PA発現プラスミドpSE1PA1-9の造成:

上で得られたpSE1PA1-5DNA約2

約30μgのY-0緩衝液に溶かし、12単位のKpn Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。さらに、1.5μgの2M NaClと8単位のHind IIIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、APTT法を用いて約5.0 kbのDNA断片を精製した。一方、pSE1PA1-5 DNA約2μgを30μgのY-0緩衝液に溶かし、12単位のKpn Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。さらに、1.0μgの2M NaClと10単位のNco Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、APTT法を用いて約4.9 kbのDNA断片を精製した。また第26図に示す4種の合成DNA(47塩基、49塩基、49塩基および47塩基:これらの合成DNAはt-PAcDNAの5'非翻訳領域の一部を構成する)



(5) 組換えプラスミドpUC19Hの造成 (Ap耐性遺伝子のポータブル化):

ノルランダーらが造成したプラスミドDNA pUC19 [Norrander, J. ら: ジーン(Gene) 26, 101(1983): pUC19プラスミドDNAは宝摺通社より入手できる]を持つ大腸菌E8101株を培養し、培養液から常法によりpUC19DNAを精製した。得られたpUC19DNA約2μgを30μgのY-50緩衝液に溶かし、10単位のHind IIIと1単位のDra Iを加え、37℃で1時間消化反応を行った。この反応により、DNAはHind IIIで完全に、Dra Iで部分的に消化された。65℃、10分間の熱処理後、APTT法を用い、約1.55 kbのHind III-Dra I断片と約1.1 kbのDra I-Hind III断片の2種のDNA断片を精製した。更に、20ピコモル(pmoles)のHind IIIリンカー(CAAGCTTG:コラボレイティブ・リサーチ社製)を実験例1で述べた方法と同様の方法を用いて5'リシン酸化した。

このようにして得られたpUC19由来の約

をアプライド・バイオシステムズ社380A-DNA合成器を用いて合成し、それぞれ別々に実験例1で述べた方法と同様の方法を用いて5'リシン酸化した。

このようにして得られたpSE1PA1-5由来の約5.0 kbのDNA断片(約0.1 μg)とpSE1PA1-5由来の約4.9 kbのDNA断片(約0.1 μg)と5'リシン酸化された4種の合成DNA(それぞれ1 pmoleずつ)を20μgのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、50単位のT4 DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNA pSE1PA1-9を単離し、制限酵素消化による構造解析およびM13ファージを用いたディテオキシ・シークエンス法により、pSE1PA1-9が目的の構造を有することを確認した(第26図参照)。

1.55 kbのDNA断片(0.03 μg)と約1.1 kbのDNA断片(0.03 μg)および1ピコモルの5'リシン酸化されたHind IIIリンカーを20μgのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、50単位のT4 DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNA pUC19Hを単離し、制限酵素消化による構造解析を行ったところ、目的の構造を有することを確認した(第27図参照)。

(6) 組換え体プラスミドpSE1PA1-9Aの造成

(pSE1PA1-9へのAp耐性遺伝子の導入):

上で得られたpUC19HプラスミドDNA約2μgを30μgのY-50緩衝液に溶かし、8単位のHind IIIと8単位のPru IIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。フェノール抽出とクロロホルム抽出の後、エタノール沈殿によってDNA断片を回収した。このDNA断片を

全量40μgのポリメラーゼ緩衝液に溶かし、8単位のタレノー断片を加え、15℃で1時間反応させることにより、Hind III突出末端を平坦末端に変えた。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約1.4kbのDNA断片を精製した。一方、上で得られた λ -PA発現プラスミドpSE1PA1-9約2μgを30μgのY-150緩衝液に溶かし、8単位のXba Iと8単位のEco RVを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約5.9kbのDNA断片を精製した。また、上で精製したpAGE28プラスミドDNA約3μgを30μgのY-150緩衝液に溶かし、10単位のXba Iと10単位のEco RVを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約0.85kbのDNA断片を精製した。

このようにして得られたpUC19H由来の約1.4kbのDNA断片(約0.1μg)とpSE1PA1-9由来の約5.9kbのDNA断片(約0.1μg)と

を行った。フェノール抽出とクロロホルム抽出の後、エタノール沈殿によってDNA断片を回収した。このDNA断片を全量40μgのポリメラーゼ緩衝液に溶かし、8単位のタレノー断片を加え、15℃で1時間反応させることにより、Asp718突出末端を平坦末端に変えた。次いでフェノール抽出とクロロホルム抽出の後、エタノール沈殿によって回収したDNA断片を全量30μgのY-150緩衝液に溶かし、10単位のMlu Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約3.3kbのDNA断片を精製した。

これとは別に、dhfr遺伝子を運ぶpSV2dhfrプラスミドDNA(スブラニ(Subranai)ら:モレキュラー・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.)1, 854 (1981))約3μgを30μgのY-100緩衝液に溶かし、12単位のBgl IIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。フェノール抽出とクロロホルム

pAGE28由来の約0.85kbのDNA断片(約0.05μg)を20μgのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、100単位のT4 DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を挑戦株とし、ApとK_sの両方に耐性になった株を得た。この挑戦株からプラスミドDNA pSE1PA1-9Aを単離し、制限酵素消化による構造解析を行ったところ、目的の構造を有することを確認した(第28図参照)。

プラスミドDNA pSE1PA1-9Aを含む微生物はEscherichia coli BpPA1-9A PERN BP-1460として昭和62年9月3日付で微生物に寄託している。

(7) 組換え体プラスミドpSE1dhfrIAの造成:

上で得られたpAGE106プラスミドDNA約2μgを30μgのY-50緩衝液に溶かし、12単位のAsp718(ペーリンガー・マンハイム社製)を加え、37℃で2時間消化反応

ム抽出の後、エタノール沈殿によってDNA断片を回収した。このDNA断片を全量40μgのポリメラーゼ緩衝液に溶かし、8単位のタレノー断片を加え、15℃で1時間反応させることにより、Bgl II突出末端を平坦末端に変えた。次いで、フェノール抽出とクロロホルム抽出の後、エタノール沈殿によって回収したDNA断片を全量30μgのY-100緩衝液に溶かし、12単位のHind IIIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約0.75kbのDNA断片を精製した。また、上で得られたpSE1PA1-9AプラスミドDNA約3μgを30μgのY-100緩衝液に溶かし、12単位のHind IIIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。さらに、1.5μgの1M NaClと12単位のMlu Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約2.9kbのDNA断片を精製した。このようにして得られたpAGE106由来の

DNA断片(約0.1μg)とpSV2dhfr由来のDNA断片(約0.03μg)とpSE1PA1-9A由来のDNA断片(約0.1μg)を20μgのT4DNAリガーゼ緩衝液に溶かし、100単位のT4DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNAPSE1dhfr1Aを単離し、制限酵素消化による構造解析を行ったところ、目的の構造を有することを確認した(第29図参照)。

(b) 組換え体プラスミドpSE1PA1SE1dhfr1-9Aの造成:

上で得られたpSE1dhfr1AプラスミドDNA約3μgを30μgのY-100緩衝液に溶かし、12単位のXbaIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。フェノール抽出とクロロホルム抽出の後、エタノール沈殿によってDNA断片を回収した。このDNA断片を全量

出とクロロホルム抽出の後、エタノール沈殿によって回収したDNA断片を全量30μgのY-150緩衝液に溶かし、12単位のMspIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。85℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約6.75KbのDNA断片を精製した。

このようにして得られたpSE1dhfr1A由来のDNA断片(約0.1μg)とpSE1PA1-9A由来のDNA断片(約0.1μg)を20μgのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、100単位のT4DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNAPSE1PA1SE1dhfr1-9Aを単離し、制限酵素消化による構造解析を行ったところ、目的の構造を有することを確認した

(第29図 参照)。

4.0μgのポリメラーゼ緩衝液に溶かし、6単位のクレノー断片を加え、15℃で1時間反応させることにより、XbaI突出末端を平坦末端に変えた。続いて、フェノール抽出とクロロホルム抽出の後、エタノール沈殿によって回収したDNA断片を全量30μgのY-150緩衝液に溶かし、12単位のMspIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。85℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約4.4KbのDNA断片を精製した。

これとは別に、上で得られたpSE1PA1-9AプラスミドDNA約3μgを30μgのY-150緩衝液に溶かし、12単位のClaIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。フェノール抽出とクロロホルム抽出の後、エタノール沈殿によってDNA断片を回収した。このDNA断片を全量4.0μgのポリメラーゼ緩衝液に溶かし、6単位のクレノー断片を加え、15℃で1時間反応させることにより、ClaI突出末端を平坦末端に変えた。続いて、フェノール抽

参考例10:

hG-CSF発現プラスミドpAS3-3の造成: (第30および31図参照)。

(1) 組換え体プラスミドpCSF3-3の造成:

参考例4で得たpCSF2、2μgを20μgのY-150緩衝液に溶かし、制限酵素SalIを10単位加え、37℃で2時間消化反応を行った。その後、制限酵素ApaLIを5単位加え、37℃でさらに10分間部分切断反応を行った。この反応液からLGT法により、約4.0KbのDNA断片(SalI-ApaLI断片)約1.5μgを得た。

一方、hG-CSFの翻訳領域を完全に含むcDNAを得るために、下記に示した3つのDNAリンカーを合成した。

Sa I
 5'-TCGACGGAGCTGCAAGCCAGCCCCACCC- 3' (29mer)
 3'-GCCCTGGACGCTGGGGTCGGGGTCTGGG- 5' (31mer)

Nco I ——シグナル配列 ——
 -30
 NetAlaGlyProAlaThrGlnSerPro
 5'-AGACCEAISGGCTGGACCTGCAACCCAGAGCCC- 3' (32mer)
 3'-TACCGACCTGGACGGTGGTCTCGGGGTAC- 5' (30mer)

-20 -10 Apa I
 MetLysLeuMetAlaLeuGlnLeuLeuLeuTyrGlnSer
 5'-CATGAAGCTGATGGCCCTGCAAGCTGCTGCTGTGGCACAC- 3' (39mer)
 3'-TTCGACTACCGGGACGTCGACGACGACACCGTGTCACG- 5' (39mer)

上に示した 29mer、31mer、32mer、

30mer および 39mer (2種) の一本鎖 DNA

Aは、アプライド・バイオシステムズ社 380

A・DNA 合成機を用いて合成した。

互いに相補的な 29mer と 31mer は各々 20

ピコモルずつを 40 μg の T4 キナーゼ標識液に

溶かし、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ 8 単位

を加えて、37℃で 60 分間リソマル化反応を行

った。互いに相補的な 32mer と 30mer およ

び 39mer 同様についても同様にしてリソマル化

反応を行った。

反応液から LGT 法により約 0.7 Kb の DNA 断片 (Dra I - Sa I 断片) 約 0.6 μg を得た。

これとは別に、参考例 9 で得た pAGE 106、

2 μg を 30 μg の Y-0 標識液に溶かし 制限酵素

Sma I 10 単位を加え、37℃で 2 時間切断

反応を行った。その後、NaCl の濃度が 150

mM になるように NaCl を添加し、制限酵素

Sa I を 40 単位加えて、37℃でさらに 2

時間切断反応を行った。この反応液から LGT

法により約 5.0 Kb の DNA 断片 (Sma I -

Sa I 断片) 約 1.5 μg を得た。

次に上記で得た、pCSF 3-3 由来の Dra I - Sa I 断片 (約 0.7 Kb) 約 0.6 μg と pAGE 106 由来の Sma I - Sa I 断片 (約 5.0 Kb) 約 1.0 μg を T4 DNA 9 キナーゼ標識液 25 μg に溶かし、400 单位の T4 DNA 9 キナーゼを加え、4℃ 18 時間結合反応を行った。

該反応液を用いて大腸菌 HB 101 棒を形質転換し、Ap 耐性株を取得した。該形質転換株よりプラスミドを単離し、制限酵素切断による

上記で得られた pCSF 2 由来の Sa I - Apa I 断片 (約 4.0 Kb) 0.1 μg を T4 DN A 9 キナーゼ標識液 3.0 μg に溶かした後、上記 3 種の DNA リンカーを 2 ピコモルずつ加えた。さらに T4 DN A 9 キナーゼ 4.0 単位を加え、4℃で 18 時間結合反応を行った。

該反応液を用いて大腸菌 HB 101 棒を形質転換し、Ap 耐性株を取得した。該形質転換株よりプラスミド DNA を単離し、制限酵素切断による構造解析を行った結果、目的とするプラスミド DNA、pCSF 3-3 であることを確認した。

(2) hG-CSF 発現プラスミド pSE1GC 3-3 の造成：

前項で得た pCSF 3-3、3 種を 4.0 μg の Y-0 標識液に溶かし 制限酵素 Dra I 10 単位を加えて、37℃で 2 時間消化反応を行った。NaCl の濃度が 150 mM になるように NaCl を添加し、制限酵素 Sa I 10 単位を加えて、37℃でさらに 2 時間切断反応を行った。この

構造解析を行った結果、目的とするプラスミド DNA、pSE1GC 3-3 であることを確認した。

(3) hG-CSF 発現プラスミド pAS 3-3 の造成：

pCT18.1 (参考例 15 参照) 5 μg を 5.0 μg の Y-100 標識液に溶かし、制限酵素 Hind III および Bam HI を各々 10 単位加え、37℃で 2 時間消化反応を行った。この反応液から LGT 法により約 1.6 Kb の DNA 断片 (Hind III - Bam HI 断片) 1 μg を得た。この約 1.6 Kb の DNA 断片 1 μg を 5.0 μg の Y-100 標識液に溶かし、制限酵素 Dde I (東洋紡織社製) を 10 単位加え 37℃で 2 時間消化反応を行った。フェノール・タロロホルム抽出およびエタノール沈殿で DNA を回収し、3.0 μg のタレノール標識液に溶かし、DNA ポリメラーゼ I・タレノール断片を 2 単位加えて 37℃で 1 時間反応を行った。6.8℃で 10 分間処理し DNA ポリメラーゼ I・タレノール断片を失

特開平2-227075 (52)

活させた後、エタノール沈殿でDNAを回収した。回収したDNAは2.0mgのK-50緩衝液に溶かし制限酵素Aat II (東洋紡織社製) 10単位を加えて37°Cで2時間切断反応を行った。この反応液よりLGT法により約0.2kbのDNA断片 [Dde I (平塙末端) - Aat II 断片] 約0.1mgを得た。

別に前項で得たpSE1GC3-3の2端を2.0mgのK-50緩衝液に溶かし、制限酵素Aat II (東洋紡織社製) 10単位を加え、37°Cで2時間消化反応を行った。その後、制限酵素Xba Iを10単位加え、37°Cでさらに2時間消化反応を行った。この反応液よりLGT法により約0.8kbのDNA断片 (Aat II - Xba I 断片) 約0.1mgを得た。

一方、参考例9で得たpSB1PA1SB1dhfr1-9Aの2端を2.0mgのY-0緩衝液に溶かし、制限酵素Sma Iを10単位加え、37°Cで2時間消化反応を行った。その後、NaCl濃度が1.00mMになるようにNaClを添加し、制限酵素

Xba Iを10単位加え、37°Cでさらに2時間消化反応を行った。この反応液からLGT法により約8.7kbのDNA断片 (Sma I - Xba I 断片) 約1mgを得た。

上記のようにして得たpCfTA1由来のDde I (平塙末端) 、Aat II断片 (約0.2kb) 約0.1mg、pSE1GC3-3由来のAat II - Xba I 断片 (約0.8kb) 約0.1mg、pSE1PA1SE1dhfr1-9A由来のSma I - Xba I 断片 (約8.7kb) 約1mgを30μlのT4 DNAリガーゼ緩衝液に溶かし400単位のT4 DNAリガーゼを加え、4°Cで18時間結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌HB101株を感受性株し、Ap耐性株を得た。該感受性株よりプラスミドを単離し、制限酵素切断による構造解析を行った結果、目的の構造を有するプラスミドDNA、pAS3-3であることを確認した。

参考例11.

組換え体プラスミドpUKA2の造成：

参考例2で得られたヒトpro-UCDNAを運ぶプラスミドpUK1を持つ大腸菌C600SF8株から常法によりpUK1DNAを調製した。得られたpUK1DNA約2mgをY-100緩衝液30μlに溶かし、8単位の制限酵素Eco Iと8単位のStu Iを加え、37°Cで2時間消化反応を行った。65°C、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約1.2kbのDNA断片を精製した。一方、参考例5で得られたpTrS33プラスミドDNA約2mgを10mM Tris-HCl(pH 7.5)、25mM KCl、7mM MgCl₂、5mM 2-メルカプトエタノールを含む液体(以下、“K-25緩衝液”と略称する)30μlに溶かし、16単位の制限酵素Sse Iを加え、30°Cで2時間消化反応を行った。続いて1.5μlの1M NaClと10単位のEco Iを加え、さらに37°Cで2時間消化反応を行った。65°C、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約2.85kbのDNA断片を精製した。

このようにして得られたpUK1由来の約1.2kbのDNA断片(約0.05mg)とpTrS33由来の約2.85kbのDNA断片(約0.1mg)を、全量20μl

のT4リガーゼ緩衝液に溶かし、T4 DNAリガーゼ100単位を加え、4°Cで18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を感受性株し、Ap耐性株を得た。この感受性株からプラスミドDNA、pUKA2を単離し、制限酵素消化による構造解析を行ったところ、目的の構造を有することを確認した(第32図参照)。

参考例12.

組換え体プラスミドpUKB101の造成：

上で得られたpUKA2プラスミドDNA約2mgをY-0緩衝液30μlに溶かし、12単位の制限酵素Kpn Iを加え、37°Cで2時間消化反応を行った。続いて1.5μlの2M NaClと10単位のEco Iを加え、さらに37°Cで2時間消化反応を行った。65°C、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約1.2kbのDNA断片を精製した。一方、参考例5で得られたpTrS33プラスミドDNA約2mgを30μlのK-25緩衝液に溶かし、16単位のSse Iを加え、30°Cで2

時間消化反応を行った。続いて $1.5 \mu\text{M}$ の 2M NaCl と 10 単位の Pst I を加え、さらに 37°C で 2 時間消化反応を行った。 65°C 、10 分間の熱処理後、 AFT 法を用いて約 1.1Kb の DNA 断片を精製した。また、参考例 6 で得られた pTerm2 プラスミド DNA 約 2ng を $30\mu\text{M}$ の $\text{Y}-0$ 級核酸液に溶かし、12 単位の Kpn I を加え、 37°C で 2 時間消化反応を行った。

続いて $1.5 \mu\text{M}$ の 2M NaCl と 10 単位の Pst I を加え、さらに 37°C で 2 時間消化反応を行った。 65°C 、10 分間の熱処理後、 AFT 法を用いて約 1.7Kb の DNA 断片を精製した。また、下記 2 種の合成 DNA A (41mer と 45mer) をアプライド・バイオシステムズ社 380A・DNA 合成機を用いて合成した。

5'-GGGAATGGTCACTTTACCGAGGAAAGGCCAGCACTGACAC-3' (41mer)
/-CCCTTACCACTGAAAAATGGCTCCCTTCCGGTCTGACTGTTGAC-5' (45mer)

これらの合成 DNA A を 20 ピコモル (pmoles) ずつ別々に、 $20\mu\text{M}$ の T4 キナーゼ緩衝液中で 5 单位の T4 ポリヌクレオチドキナーゼを加え、 37°C で 30 分間反応させることにより、合成 DNA の 5' 末端をリン酸化した。

の Bcl I と 12 単位の Hind III を加え、 37°C で 2 時間消化反応を行った。 65°C 、10 分間の熱処理後、 AFT 法を用いて約 0.45Kb の DNA 断片を精製した。一方、実施例 11 の (ii) で得られた pUKA-2 プラスミド DNA 約 2ng を $30\mu\text{M}$ の $\text{Y}-0$ 級核酸液に溶かし、10 単位の Kpn I を加え、 37°C で 2 時間消化反応を行った。続いて $1.5 \mu\text{M}$ の 2M NaCl と 10 単位の Nde I を加え、さらに 37°C で 2 時間消化反応を行った。 65°C 、10 分間の熱処理後、 AFT 法を用いて約 1.2Kb の DNA 断片を精製した。また、参考例 6 で得られた pTerm2 プラスミド DNA 約 2ng を $30\mu\text{M}$ の $\text{Y}-0$ 級核酸液に溶かし、10 単位の Kpn I を加え、 37°C で 2 時間消化反応を行った。続いて $1.5 \mu\text{M}$ の 2M NaCl と 8 单位の Hind III を加え、さらに 37°C で 2 時間消化反応を行った。 65°C 、10 分間の熱処理後、 AFT 法を用いて約 2.85Kb の DNA 断片を精製した。

このようにして得られた pUK11 由来の 0.45Kb の DNA 断片 (約 0.02ng)、 pUKA-2 由来の約 1.2Kb の DNA 断片 (約 0.05ng)、および

このようにして得られた pUKA-2 由来の約 1.2Kb の DNA 断片 (約 0.05ng)、 pTrS33 由来の約 1.1Kb の DNA 断片 (約 0.05ng)、 pTerm2 由来の約 1.7Kb の DNA 断片 (約 0.05ng)、および 5' リン酸化された 2 種の合成 DNA (1 ピコモルずつ) を全量 $20\mu\text{M}$ の T4 キナーゼ緩衝液に溶かし、300 単位の T4 DNA リガーゼを加え、4℃で 18 時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌 BL294 株を感受性接種し、 ApR 耐性株を得た。この感受性接種からプラスミド DNA、 pUKB101 を単離し、制限酵素消化による構造解析および M13 ディディオキシ・シーケンス法による塩基配列決定を行ったところ、 pUKB101 は目的の構造を有することを確認した (第 33 図参照)。

参考例 13.

ヒト pro-UK 発現プラスミド pSE1UKpro1-1A の造成:
(i) 組換えプラスミド pUKP2 の造成:

参考例 3 で得られた pUK11 プラスミド DNA 約 3ng を $30\mu\text{M}$ の $\text{Y}-100$ 級核酸液に溶かし、12 単位

pTerm2 由来の 2.85Kb の DNA 断片 (約 0.05ng) を全量 $20\mu\text{M}$ の T4 キナーゼ緩衝液に溶かし、50 単位の T4 DNA リガーゼを加え、4℃で 18 時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌 BL294 株を感受性接種し、 ApR 耐性株を得た。この感受性接種からプラスミド DNA、 pUKF2 を単離し、制限酵素消化による構造解析を行ったところ、 pUKF2 は目的の構造を有することを確認した (第 34 図参照)。

② 組換えプラスミド pUKFpro の造成:

上で得られた pUKF2 プラスミド DNA 約 2ng を $30\mu\text{M}$ の 25mM NaCl を含む $\text{Y}-0$ 級核酸液に溶かし、10 単位の Bam H I (ニューイングランド・バイオラブズ社製) を加え、 50°C で 2 時間消化反応を行った。続いて $1.0 \mu\text{M}$ の 2M NaCl と 10 単位の Hind III を加え、さらに 37°C で 2 時間消化反応を行った。 65°C 、10 分間の熱処理後、 AFT 法を用いて約 4.3Kb の DNA 断片を精製した。一方、下記 8 種の合成 DNA (39mer、41mer、41mer、

39mer, 17mer, 17mer)を上で述べた方法に従い、合成および5'-末端のリン酸化を行った。

5'-AGCTTGTCCCCCAGCGCCGTCGCGCCCTGCTGCCGAG- 3' (39mer)
3'-ACAGGGGCGTCGCGGGCAGCGGGCGAGGACGGCGTCCGGTGG- 5'
(41mer)
5'-GCCACCGAAGCCGCGCCGCTAGCGCCCGACCTCGGCCAC- 3' (41mer)
3'-CTCCGGCGGCGAGATECGCGGGCTGGAGCGGGTGGTAC- 5'
(39mer)
5'-CATG AGA GCG CTG CTG 6-3' (17mer)
3'-TCT CGG GAC GAC C GCGC-5' (17mer).

このようにして得られたpUKF-2由来の約4.3KbのDNA断片(約0.1μg)と5'-リン酸化された6種の合成DNA(1ピコモルずつ)を全量20μgのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、300単位のT4DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNA、pUKFproを単離し、制限酵素消化による構造解析およびM13ディディオキジ・シークエンス法による塩基配列決定を行ったところ、pUKFproは目的の構

造を有することを確認した(第35図参照)。

④ 組換え体プラスミドpSE1UKpro-1Aの造成:

参考例9で得られたpSE1PA1-9AプラスミドDNA約2μgを30μgのY-0緩衝液に溶かし、10単位のKpnIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。続いて1.5μgの2M NaClと10単位のHindIIIを加え、さらに37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約8.3KbのDNA断片を精製した。一方、上で得られたpUKFproプラスミドDNA約3μgを30μgのY-0緩衝液に溶かし、15単位のKpnIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。続いて1.5μgの2M NaClと10単位のHindIIIを加え、さらに37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約1.55KbのDNA断片を精製した。

このようにして得られたpSE1PA1-9A由来の約6.3KbのDNA断片(約0.1μg)とpUKFpro由来の1.55KbのDNA断片(約0.05μg)を全量20μgのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、100単位の

T4DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNA pSE1UKpro-1Aを単離し、制限酵素消化による構造解析を行ったところ、pSE1UKpro-1Aは目的の構造を有することを確認した(第36図参照)。

参考例14.

1) ヒトLTCcDNAを運ぶプラスミドpLTC-Iの準備:

(1) Luk II細胞よりのボリ(A)RNAの調製:

ヒトリンパ芽球細胞株Luk IIより、チオグリアン酸グアニジン塩化リチウム法(カサラ(Catala)ら:ディーエヌエイ(DNA)2, 329 (1983)]に従い、ボリ(A)を有するRNAを下記のごとく調製した。

ヒトリンパ芽球細胞株Luk II(ペリッシュ・ワイ・ルビン(Perleish Y. Rubin)ら:プロ

シーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミィ・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 6837 (1985)]を、5%の仔牛胎児血清と1mM N-2-ヒドロキシエチルビペラシン-N'-2-エタンスルファン酸(HEPES)を含む1LのRPMI 1640培地(日本製薬社製)に、8×10⁶cells/mlとなるように接種し、増殖させた。培養にはスピナーナー・カルチャー・ボトルを用いた。37℃で48時間培養した後、遠心によって細胞を集め、10ml/mlのフェルボール・ミリステート・アセテート(PMA: Phorbol myristate acetate)と5%の仔牛胎児血清と1mM HEPESを含む、新しい1LのRPMI 1640培地に移し、さらに37℃で48時間培養した。続いて、この細胞懸濁液の一部(250ml)から1.100×g、4℃、10分間の遠心によって細胞を集め、8.0mlのリン酸塩バッファーで洗浄した後、5Mチオグリアン酸グアニジン、1.0mM EDTA、5.0mM Tris-HCl(pH 7)および

8% (V/V) 2-メルカプトエタノールからなる溶被1.0ml中でボルテックス・ミキサーを用い可溶化した。この可溶化物を遠心管に移し、4M LiClE溶被8.0mlを加えて攪拌した後、4°C、20時間静置した。Hitachi RPR10ローターにて9,000 rpm、90分間遠心後、RNAを沈殿として回収した。RNAの沈殿を4M尿素および2M塩化リチウムからなる溶被5.0mlに湛潤し、Hitachi RPR10ローターにて9,000 rpm、60分間遠心後、再びRNAを沈殿として回収した。RNAの沈殿を0.1%ラウリル硫酸ナトリウム、1mM EDTA、1.0mM Tris-HCl (pH 7.5) からなる溶被1.0mlに溶解し、フェノールークロロホルムで抽出後、エタノール沈殿により回収した。得られたRNA約2.5mgを1.0mM Tris-HCl (pH 8.0) および1mM EDTAからなる溶被1mlに湛かした。65°C、5分間インキュベートし、0.1mlの5M NaClを加えた。混合物をオリゴ(dT)セルロース・

カラム (ビー・エル・バイオケミカル (P-L Biochemical) 社製) クロマトグラフィー (カラム体積0.5ml) にかけた。吸着したオリゴ(A)を有するmRNAを1.0mM Tris-HCl (pH 7.5) および1mM EDTAからなる溶被で溶出し、オリゴ(A)を有するmRNA約1.00mgを得た。

(2) cDNA合成と該DNAのベクターへの導入：

オカヤマーバーグ (Okayama-Berg) の方法 (モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.), 2, 161 (1982)) に従い、cDNAの合成とそれを組み込んだ組換え体プラスミドの造成を行った。その工程の概略を第14図に示す。

上記で調製したオリゴ(A) RNA約2μg、ベクタープライマー約1.4μgを5.0mM Tris-HCl (pH 8.3)、8mM MgCl₂、3.0mM KCl、0.3mM DTT、2mM dNTP (dATP, dTTP, dGTPおよ

びdCTP) および1.0単位のリボヌクレアーゼインヒビター (P-L Biochemicals社製) からなる溶被2.2.3μlに溶解し、1.0単位の逆転写酵素 (生化学工業社製) を加え、41°C 90分間インキュベートし、mRNAに相補的なDNAを合成させた。該反応物をフェノールークロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、RNA-DNA二重鎖の付加したベクタープライマ-DNAを回収した。該DNAを6.6μM dCTPおよび0.2μlオリゴ(A)を含むTdT緩衝液2.0μlに湛かし、14単位のTdT (P-L Biochemicals社製) を加えて37°C 2分間インキュベートし、cDNA 3'末端に20個の(dC) 鎌を付加した。該反応物をフェノールークロロホルム抽出し、エタノール沈殿により(dC) 鎌の付加したcDNA-ベクタープライマ-DNAを回収した。該DNAを1.0mM Tris-HCl (pH 7.5)、6mM MgCl₂、および60mM NaClからなる液4.00mlに湛かし、2.0単位のHind IIIを加え、37

°C 2時間インキュベートし、Hind III部位で切断した。該反応物をフェノールークロロホルム抽出、エタノール沈殿して0.5ピコモルの(dC) 鎌付加cDNA-ベクタープライマ-DNAを得た。該DNA 0.2ピコモルおよび前記のランカー-DNA 0.4ピコモルを1.0mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.1M NaClおよび1mM EDTAからなる溶被1.00mlに湛かし、65°C、42°C、0°Cでそれぞれ10分、2.5分、3.0分間インキュベートした。20mM Tris-HCl (pH 7.5)、4mM MgCl₂、1.0mM (NH₄)₂SO₄、0.1M KClおよび0.1mM B-NADの組成で、全量100μlとなるよう反応液を調製した。該反応液に2.5単位の大腸菌DNAリガーゼ (ニューリングラント・バイオラブズ社製) を加え、11°C 18時間インキュベートした。該反応液を各4.0μMのdNTP、0.15mM B-NADとなるよう成分を追加調節し、1.0単位の大腸菌DNAリガーゼ、2.0単位の大腸菌DN

AボリメラーゼI (P-L Biochemicals社製) および10単位の大腸菌リガスクレアーゼH (P-L Biochemicals社製) を加え、12°C、25°Cで順次1時間ずつインキュベートした。上記反応で、cDNAを含む組換えDNAの環状化と、RNA-DNA二重鎖のRNA部分がDNAに置換され、完全な二重鎖DNAの組換え体プラスミドが生成した。

④ ヒトLTC DNAを含む組換えDNAの選択：

ここで得た組換え体プラスミドを用い、大腸菌C600SP8株 [カameron (Cameron) : プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミィ・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA 72, 3416 (1975)] を Scottらの方法 (遺伝構成: 細胞工学2, 616 (1983)) に従い形質転換した。得られた約30000個のコロニーをニトロセルロース・フィルター上に固定した。ジェネンテク (Genentech) 社が単離したヒトLTC DNA [パトリック・ダブリュー

10単位を加えて、37°Cで2時間切断反応を行った。次いで、NaClを終濃度150mMとなるように加え、制限酵素Nsi I (ニューアイギングランド・バイオラブズ社製) 10単位を加え、37°Cでさらに3時間切断反応を行った。反応液からLGT法によりヒトLTDNAの大部分を含む約750bpのDNA断片 (Xba II-Nsi I断片) 約0.3μgを得た。

別に、pLT1 20μgを2.0μgのY-50Kb緩衝液に溶かし、制限酵素Hae III 40単位を加えて、37°Cで2時間切断反応を行った。

次いで、NaClを終濃度150mMとなるように加え、Nsi I 40単位を加え、37°Cでさらに3時間切断反応を行った。反応液からボリアクリアルアミドゲル電気泳動法により、ヒトLTDNAのN末端部分を含む約50bpのDNA断片 (Hae III-Nsi I断片) 約4.0ngを得た。

一方、pGEL1 (3.4Kb) 3μgを全量3.0μgのY-100Kb緩衝液に溶かし、制限酵素

・グレイ (Patrick H. Gray) ら: キイチャー (Nature) 312, 721 (1984)] の5'非翻訳領域の一箇の塩基配列と一致する17merの合成DNA 5'-GATCCCCGGCCTGCCTG-3'を³²Pで標識したプローブに52°Cで強く会合した1菌株を選んだ [グルンステイン・ホグネス (Grunstein-Hogness) の方法、プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミィ・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA 72, 3981 (1975)]。この菌株が持つプラスミドpLT1のcDNAの全塩基配列を、M13ファージを用いたディデオキシ・シークエンス法により決定した。その結果、pLT1のcDNAはヒトLTDNAをコードしていることが判明した。

2) 組換え体プラスミドpLA1の造成 (第37回参照) :

前項の方法によって得たpLT1 (4.7Kb) 5μgを全量5.0μgのY-0緩衝液に溶かし、制限酵素Xba II (ペーリングガーマンハイム社製)

Sst Iと制限酵素Bgl IIそれぞれ6単位ずつを加え37°Cで3時間切断反応を行った。

この反応液からLGT法によりAp⁺遺伝子を含む約2.3KbのDNA断片 (Sst I-Bgl II断片) 約1.0μgを得た。

次に上記で得たpLT1由来のXba II-Sst I断片 (約750bp) 0.2μgおよびHae III-Nsi I断片 (約50bp) 2.0ngとpGEL1由来のSst I-Bgl II断片 (約2.3Kb) 0.6μgを全量2.0μgのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、この混合液にさらに2単位のT4DNAリガーゼ (宝酒造社製) を加え4°C 1.8時間反応を行った。

このようにして得た組換え体プラスミドDNAを用い、Escherichia coli KM430株をコーエンらの方法により形質転換し、Ap⁺のコロニーを得た。この形質転換株よりプラスミドDNAを公知の方法に従って分離精製し、該プラスミドDNAをSst I等の制限酵素で切断することによりプラスミドの構造解析を行った。

た。その結果、目的的プラスミドが　られたこ
とを確認した。この組換え体プラスミドをpLAI
と呼ぶ。

3) LT発現プラスミド pLSA1の構成(第38回参照):

前項により得られたpLAI (3.1 Kb) をもつ大腸菌KM430株を培養し、培養液から常法によりpLAIDNA 3ugをY-100緩衝液30μlに添加し、Sst IとBgl IIそれぞれ3単位ずつを加え37℃で3時間切断反応を行った。この反応液からLGT法によりヒトLT遺伝子の大部分を含む約790bpのDNA断片 (Sst I-Bgl II断片) 約0.5ugを得た。

別に、特開昭58-110800号公報記載の方法で調製したpKYP10-3段をY-100硬衝波30μに浴かし、制限酵素BamIIIと制限酵素PstIをそれぞれ6単位ずつを加え37℃で3時間切断反応を行った。この反応液からLGT法によりトリプトファンプロモータ

まず、一本鎖DNA、27-merと25-merを通常のトリエステル法により合成した。27-merおよび25-merの各々20ピコモルを全量4.0 μlのT4キナーゼ緩衝液に落かし、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造社製)6単位を加えて、37℃で60分間リン酸化反応を行った。

次に上記で得た p L A 1 由来の S t u I -
B g I I 断片 (約 7.9 0 b p) 0.3 μ g と発現ベ
クター p K Y P 1 8 の B a m H I - P s t I 断片
(約 1.1 K b) 0.4 μ g および p G E L 1 由来の
P s t I - B a m H I 断片 (約 1.7 K b) 0.6
 μ g を T 4 リガーゼ混合液 2.5 μ l に添加し、この
混合液に上記 DNA リンカーを約 1 ピコモル加
えた。この混合液にさらに T 4 DNA リガー^セ 8 單位を加え、4°C で 18 時間結合反応を行
った。

組換え体プラスミドを含む反応混合物を用いて大腸菌KM430株を選択培養し、 $\lambda p'$ のコロニーを得た。このコロニーの培養細胞からプラスミドDNAを回収した。得られたプラスミドは、 $\lambda p'$ と同様の性質を示す。

— (P tr p) を含む約1.1 KbのDNA断片 (BamH I-Pst I断片) の0.6 μgを得た。また、pGEL 1 (3.4 Kb) 2 μgをY-10.0 細胞液20 μlに添加し、制限酵素Hind III、BamH IおよびPst Iそれぞれ4単位ずつを加え37℃で3時間切断反応を行った。この反応液からLGT法によりリボプロテイン由来ターミネーターを含む約1.7 KbのDNA断片 (Pst I-BamH I断片) の0.7 μgを得た。

一方、成熟ヒト LT ポリペプチドの N 末端である Leu (CTA) から、5 番目のアミノ酸である Gly (GGC) の 2 番目の塩基 (GG) までと、発現に必要な開始コドン (ATG) を付与する必要があること、また Pcrp の下流の SDS 配列と ATG との距離は、8 ～ 18 bp の間の適当な長さにする必要があることなどの理由から、下記の DNA リンカーを合成した。

8aa III. 27-mer 799-zyf
 Met Leu Pro Gly Val
 CGATAAGCTT ATG CTA LCCAGGAGATA GG - 3'
 3' - TATTCGAA TAC GAT GGT CCT CAT CC - 5'
 25-mer

ミドの構造は制限酵素 Eco R I, Ban III, Pst I, Hind III, Bg I で切削後、アガロースゲル電気泳動により確認した。このプラスミドを pLSA 1 とよぶ。pLSA 1 の Ban III, Hind III 附近の塩基配列は下記のとおりであることをマキサム・ギルバートの方針 [エイ・エム・マキサム (A. M. Maxam) ら: プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.), USA 74, 580 (1977)] で確認した。

Base Bind Net Leu Pro Gly Val Gly Leu
CG ATA AGC TT ATG CTA CCA GGA GTA GTC CTC

参考例 15.

hG-CSF発現プラスミドpCITA1の選成(第3回発展):

参考例4により得られたpCSF1-2DNA 2 μ を全量2.0 μ のY-100 級培養液に播かし、
制限酵素Apa I [ペーリンガー・マンハイム
(Boehringer Mannheim) 社製] と BamH I せんぞ

れ10単位を加え、37℃で4時間反応を行った。この反応液からLGT法により1.5KbのDNA断片0.4μgを精製、回収した。

別に参考例14の方法で調製したプラスミドpLSA1'2'をY-100緩衝液2.0μlに溶かし、制限酵素BamH I (東洋紡織社製)とBamH Iそれぞれ10単位を加え、37℃で4時間反応を行った。この反応液からLGT法により2.8KbのDNA断片0.8μgを精製、回収した。

一方、成熟hG-CSFポリペプチドのN末端1番目から5番目までのアミノ酸 (スレオニン (ACAまたはACT)、プロリン (CCAまたはCCT)、ロイシン (CTA)、グリシン (GGC)、プロリン (CCC)) をコードするコドンと発現に必要な開始コドン (ATG) を付与する必要があること、また、トリプトファンプロモーター (P_{trp}) の下流のSD-配列とATGとの距離を、8~18bpの間の適当な長さにする必要があることなどの理由から、下記のDNAリンクーを合成した。

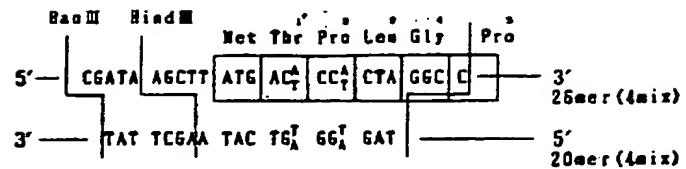
大腸菌HB101株 [ボリバー (Bolivar) ら: ジーン (Gene) 2, 75 (1977)] をコードンらの方法 (エス・エス・コーベン (S. S. Cohen) ら: プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) U.S.A. 69, 2110 (1972)] により挑戦転換し、Ap^rのコロニーを得た。このコロニーの培養液からプラスミドDNAを回収した。得られたプラスミドの構造は、BamH I、Rsa I、Pst I、Hind III、Bgl IIで切断後、アガロースゲル電気泳動により確認した。このプラスミドをpCfTA1とよぶ。pCfTA1のBamH I、Hind III付近の塩基配列は下記のとおりであることを、M13ファージを用いたディオキシ・シーケンス法で確認した。

BamH Hind III
CGAT A AGCTT ATG ACT CCT CTA GGC CCT

考例16.

pCfBD2'8の造成:

(1) hG-CSF cDNAの3'-非翻訳領域の一



まず一本縄DNA、26merと20merを通常のトキエヌテル法 [アール・クレア (R. Crea) ら: プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) U.S.A. 75, 5765 (1978)] により合成した。26mer、20merのそれぞれ2端をT4キナーゼ緩衝液に溶かし、T4ポリヌクレオチドキナーゼ30単位を加えて、37℃60分間リン酸化反応を行った。

上記で得たpCSF1-2由来のApal-BamH I断片 (1.5Kb) 0.4μgとpLSA1由来のBamH I-BamH I断片 (2.8Kb) 0.2μgとを2.5μlのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、この混合液に上記DNAリンクーを0.1μg加えた。この混合溶液にさらにT4 DNAリガーゼ6単位を加え、4℃、18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて

部を欠失したプラスミドpCfTB2'0の造成
(第40回参照):

参考例15で得られたhG-CSF発現プラスミドpCfTA1 (4.3Kb) 2'をY-100緩衝液2.0μlに溶かし、制限酵素BamH I 4単位を加えて37℃4時間消化反応を行った。フェノールークロロホルム抽出の後、エタノール沈澱により、DNA断片1.8μgを回収した。このDNA断片をクレノー緩衝液20μlに溶かし、dATP、dTTP、dCTP、dGTPをそれぞれ1mMになるように加え、さらに4単位のDNAポリメラーゼI・クレノー断片を加えて、室温で1時間反応させ、突出末端を平坦末端に変換した。フェノールークロロホルム抽出後、エタノール沈澱により、DNA断片1.6μgを回収した。該DNA断片をY-100緩衝液2.0μlに溶かし、1.0単位のEcoRIを加え、37℃4時間切断反応を行った。この反応液からLGT法により2.5KbのDNA断片 [BamH I (平坦末端)-EcoRI断片] 1μgを得た。

別に、pCfTA1 2 級を 2.0 μg の Y-100 級緩衝液に溶かし、1.0 単位の EcoRI を加え、37 ℃ 4 時間切断反応を行った後、NaCl 濃度が 1.50 mM となるように NaCl を添加し、1.0 単位の DraI を加え、37 ℃ 4 時間切断反応を行った。アガロースゲル電気泳動にて完全な分解を確認した後、hG-CSP cDNA を含む 1.0 Kb の DNA 断片 (EcoRI-DraI 断片) 0.2 級を、LGT 法により精製、回収した。

上記で得た BamHI (平塙実績) - EcoRI 断片 (2.5 Kb) 0.2 級と EcoRI - DraI 断片 (1.0 Kb) 0.2 級を T4 リガーゼ緩衝液 2.5 級に溶かし、この混合液に T4 DNA リガーゼ 6 単位を加え、4 ℃ 18 時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて大腸菌 HB101 株を挑戦株とし、Ap^r のコロニーを得た。このコロニーの培養液よりプラスミド DNA を回収した。得られたプラスミドの構造は、HindIII、PstI で切断後、アガロースゲル電気泳動により確認した。このプラスミド

を pCfTB2 と呼ぶ。

(2) hG-CSP の N 末端アミノ酸を置換したオリベプチドをコードするプラスミド pCfTL38 の造成 (第 41 図 頃) :

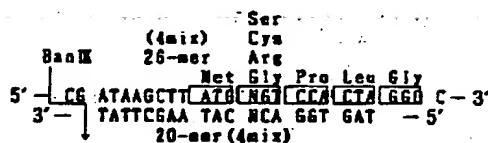
参考例 4 の方法によって得た pCSF1-2 (4.5 Kb) 3 級を 6.0 μg Y-100 級緩衝液に溶かし、制限酵素 ApaI (ベーリンガー・マンハイム社製) と制限酵素 BamHI それぞれ 8 単位ずつを加え、37 ℃ で 3 時間切断反応を行った。この反応液から LGT 法により hG-CSP 遺伝子の大部分を含む約 1.5 Kb の DNA 断片 (ApaI - BamHI 断片) 約 0.4 μg を得た。

一方、pGEL1 [開発者: プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA 82, 4306 (1985)] (E. coli) I GEL1 FERM BP-629 の培養液から常法により採取 (3.4 Kb) 2 級を Y-100 級緩衝液 4.0 級に溶かし、制限酵素 HindIII、BamHI および PstI それぞれ 4 単位ずつを加え 37 ℃ で 3 時間切断反応を行

った。この反応液から LGT 法により、リボプロテイン由来ターミネーターを含む約 1.7 Kb の DNA 断片 (PstI - BamHI 断片) 約 0.5 μg を得た。

別に、特開昭 58-110660 号公報記載の方法で回収した pKYP10 3 級を Y-100 級緩衝液 6.0 μg に溶かし、制限酵素 BamIII (東洋紡績社製) と制限酵素 PstI をそれぞれ 6 単位ずつ加え 37 ℃ で 3 時間切断反応を行った。この反応液から LGT 法によりトリプトファンプロモーター (P_{trp}) を含む約 1.1 Kb の DNA 断片 (BamIII - PstI 断片) 約 0.5 μg を得た。

一方、成熟 hG-CSP の N 末端のアミノ酸である Thr を Ser, Cys, Arg または Gly のうちのいずれかに置換し、発現に必要な開始コドン (ATG) を付与する必要があること、また P_{trp} の下流の SD 配列と ATG との距離は、6~18 bp の間の適当な長さにすることなどの理由から、下記の DNA リンカーを合成した。



(N は G, A, T または C のいずれかの塩基である)

まず、一本鎖 DNA、2.6-mer と 2.0-mer を通常のトリエステル法により合成した。2.6-mer および 2.0-mer の各々 2.0 ピコモルを 4.0 μg の T4 リガーゼ緩衝液に溶かし、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ 6 単位を加えて、37 ℃ で 6.0 分間リン酸化反応を行った。

次に上記で得た pCSF1-2 由来の ApaI - BamHI 断片 (約 1.5 Kb) 0.3 μg と pGEL1 由来の PstI - BamHI 断片 (約 1.7 Kb) 0.2 μg および発現ベクター pKYP10 の BamIII - PstI 断片 (約 1.1 Kb) 0.2 μg を全量 3.0 μg の T4 リガーゼ緩衝液に溶かし、この混合液に上記 DNA リンカーを約 1 ピコモル加えた。この混合液にさらに 6 単位の T4 DNA リガーゼを加えて 4 ℃、18 時間結合反応を行った。

組換え体プラスミドを含む反応混合物を用いて大腸菌C800SP8 (PERM BP-1078) [カameron (Cameron)ら: プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.), USA 72, 3416 (1975)] を選択変換し、Ap^r のコロニーを得た。この選択変換株よりプラスミドDNAの構造はPst I, Eco RI, Bam HIで切断後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により確認した。このプラスミドを第41図に示したとおりpCITL38とよぶ。上記プラスミド中のhG-CSF構造体遺伝子のN末端付近の配列は

Met Ser Pro Leu Gly Pro Ala
pCITL38-ATG AGT CCA CTA GGC CCT GCG

であることをM13ファージを用いたディオキシ・シーケンス法により確認した。

四 組換え体プラスミドpCITWD1の造成 (第42図参照):

参考例15の方法で得たpCITAI 5 μ を50 μ のY-100緩衝液に溶かし、制限酵素Stu I

dCTP, dGTPをそれぞれ100 μ Mになるように加え、DNAポリメラーゼI・クレノー断片を2単位加え1.7℃で1.5分間反応を行った。8.8℃で10分間処理してDNAポリメラーゼI・クレノー断片を失活させた後、NaClを100mMとなるように加え、制限酵素Pst Iを5単位加え37℃で1時間消化反応を行った。反応液からLGT法によりミクロターミネーターを含む約L8KbのDNA断片 [Bam HI (平端末端) - Pst I断片] 約0.6 μ を得た。これとは別に、pGEL1の4 μ を40 μ のY-100緩衝液に溶かし、制限酵素Bam HI (東洋精機社製) 10単位とPst I 10単位を加え37℃で1時間消化反応を行い、反応液から、LGT法でトリプトファン系プロモーターを含む約1KbのDNA断片 (Bam HI - Pst I断片) を0.4 μ を得た。

上記で得たpCITAI由来のBam HI - Stu I断片 (約1.3Kb) 約0.2 μ , pKYP26由来のBam HI (平端末端) - Pst I

10位と、制限酵素Bam HI (東洋精機社製) 10単位を加えて、37℃で1時間消化反応を行った。反応液からLGT法によりhG-CSF cDNAを含む約L3KbのDNA断片 (Bam HI - Stu I断片) 約0.5 μ を得た。別に、参考例2の方法で製造したpKYP26 3 μ を50 μ のY-100緩衝液に溶かし、Bam HI 6単位を加えて、30℃で1時間消化反応を行った。

これに10mM Tris-HCl (pH7.5), 1mM EDTAで飽和したフェノールを等量加え、激しく振拌した後、低速遠心分離法 (3,300 rpm, 10分間, 以下同条件) により水層を集めた。等量のクロロホルムを加え、激しく振拌した後低速遠心分離法により水層を集めた。1/10量の3M酢酸ナトリウムを加え、2.5倍量のエタノールを加え、-20℃, 1時間静置した。冷却遠心分離法 (4℃, 11,000 rpm 10分間) で沈殿を集めた。この沈殿を30 μ のクレノー緩衝液に溶かし、dATP, dTTP,

dCTP, dGTPをそれぞれ100 μ Mになるように加え、DNAポリメラーゼI・クレノー断片を2単位加え1.7℃で1.5分間反応を行った。8.8℃で10分間処理してDNAポリメラーゼI・クレノー断片を失活させた後、NaClを100mMとなるように加え、制限酵素Pst Iを5単位加え37℃で1時間消化反応を行った。

該反応液を用いて大腸菌HB101株を選択変換し、Ap^r のコロニーを得、このコロニーより既記バーンボイムらの方法によりプラスミドDNAを回収し、第42図に示したpCITWD1を得た。

(4) pCIT95K19の造成 (第43図参照)

pCITL38の5 μ を50 μ のY-100緩衝液に溶かし、制限酵素Hind IIIとBgl IIを10単位ずつ加え、37℃で1時間消化反応を行った。反応液からLGT法によりトリプトファン系プロモーターを含む約2.8KbのDNA断片 (Hind III - Bgl II断片) 約0.7 μ を得た。別にpCITL38, 100 μ を1.5mlのY-100緩衝液に溶かし、制限酵素Bam HIとHind IIIを80位ずつ加え、37℃で

特開平2-227075 (61)

6時間消化反応を行った。反応液からLGT法によりhG-CSPcDNAを含むDNA断片を回収し、ELUTIP™-d (Schleicher & Schuell社製) で精製した。このDNA断片を90μgのY-150緩衝液に溶かし、制限酵素Dpn I (Boehringer Mannheim社製) 3単位を加え37℃で15分間消化反応を行った。反応液からボリアクリルアミド電気泳動法で、hG-CSPcDNAを含む約300bpのDNA断片 (Hind III-Dpn I断片) 約1mgを得た。別にpCfTL38由来のHind III-Bgl II断片 (約2.8Kb) 約0.1μg、pCfTL38由来のHind III-Dpn I断片 (約300bp) 約0.2μg、pCfTB20由来のAva I (平塙支端) -Bgl II断片 (約480bp) 約0.15μgを30μgのT4DNAリガーゼ緩衝液に溶かし、4単位のT4DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。該反応液を用いて大腸菌HB101株を飛沫転換し、Ap^rのコロニーを得、このコロニーより前記バーンボイムらの方法によりプラスミドDNAを回収し、第43図に示したpCfT95K19を得た。

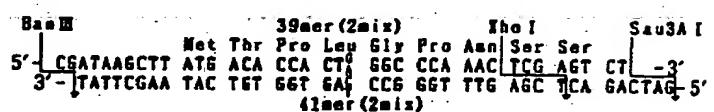
④ pCfAA1の造成 (第43図参照) :

前項で得たpCfT95K19 5mgを50μgのY-100緩衝液に溶かし、制限酵素Bgl II

(東洋紡績社製) 7単位とBgl II (日本グーン社製) 2単位を加え、37℃で1時間消化反応を行った。反応液からLGT法によりトリプトファン・プロモーター部分を含む約1KbのDNA断片 (Bgl II-Bgl II断片) 約0.5mgと、エコオクターミネーター部分を含む約1.8KbのDNA断片 (Bgl II-Bgl II断片) 約1mgを得た。

これとは別に1.5mgのpCfT95K19を150μgのY-100緩衝液に溶かし、制限酵素Bgl II (日本グーン社製) 8単位とSau3A I 10単位を加え37℃で1時間消化反応を行った。反応液からボリアクリルアミドゲル電気泳動法によりhG-CSPcDNA部分を含む約350bpのDNA断片 (Bgl II-Sau3A I断片) 約0.3mgを得た。

これとは別に、下記のDNAリンクを合成した。



まず、一本鎖DNA、39-merと41-merを通常のトリエスチル法により合成した。39-merおよび41-merの各々2.0ピコモルを全量40μgのT4キナーゼ緩衝液に溶かし、T4ボリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造社製) 6単位を加えて、37℃で60分間リン酸化反応を行った。

次に上記で得たpCfT95K19由来のBgl II-Bgl II断片 (約1Kb) 0.1mg、Bgl II-Bgl II断片 (約1.8Kb) 0.05mg、Bgl II-Sau3A I断片 (約350bp) 0.1mgをT4DNAリガーゼ緩衝液25μgに溶かし、この混合液に上記DNAリンクを約2ピコモル加えた。さらにT4DNAリガーゼ6単位を加え、4℃で18時間結合反応を行った。

該反応液を用いて大腸菌HB101株を飛沫転換し、Ap^rのコロニーを得、このコロニー

より前記バーンボイムらの方法によりプラスミドDNAを回収し、第43図に示したpCfAA1を得た。前記ディオキシ・シータエンス法でpCfAA1のDNAランカー部分の塩基配列を決定したところ、4番目のアミノ酸であるLeuをコードするコドンの3番目の塩基はAであることが判明した。このpCfAA1ではhG-CSFの10番目のProから23番目のLysまでの14アミノ酸をコードするDNA部分が欠失している。また、hG-CSFの8番目のAlaがAsnに変化する変異が導入されており、新たにXbaIサイトが生じる。

(4) pCfAB5の造成(第43図参照)：

前項で得たpCfAA1 3μgを3.0μgのY-100凝集液に溶かし、制限酵素XbaIを5単位加え、37℃で1時間消化反応を行った。アガロースゲル電気泳動法でXbaI切断が完全に行われていることを確認したのち、制限酵素BglII(日本グリーン社製)を1単位加え、37℃で25分間部分消化反応を行った。反応液か

らLGT法によりトリプトファン・プロモーター一部およびEppendorfネーター部分を含む約3kbのDNA断片(XbaI-BglII断片)約1kgを得た。これとは別に、下記のDNAランカーを合成した。

XbaI
 Ser Ser Leu Pro Glu Ser Phe Leu
 TCG AGT CTA CCA CAG AGC TTC CT
 TCA GAT GGT GTC TCG AAG GAAAATT
 23mer
 25mer

(Cys)
 (Ser)
 61y
 Leu Lys Arg Leu Glu Glu Val Arg Lys
 TTTA AAA NGC TTA GAG CAA STG AGG AA
 T TCG AAT CTC GTT CAC TCC TTCTAG 27mer(4mix)
 25mer(4mix)

(NはG, A, TまたはC)

このランカーDNAはpCfAA1のhG-CSF cDNAで欠失していたhG-CSFの10番目のProから23番目のLysまでの14アミノ酸をコードするDNA部分を含んでいる。

まず、一本鎖DNA、27-merと25-mer(2種)と23-merを通常のトリエステル法により合成した。たがいに相補的な27-mer

と25-merおよび25-merと23-merのDNA 20ピコモルずつを各々全量40μgのT4キナーゼ凝集液に溶かし、T4ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造社製)6単位を加えて、37℃で60分間リン酸化反応を行った。

次に上記で得たpCfAA1由来のXbaI-BglII断片(約3kb)0.1kg、前項で得たpCfT95K19由来のBglII-Sau3AI断片(約350bp)0.1kgをT4DNAリガーゼ凝集液30μgに溶かし、この混合液に上記DNAランカーを2ピコモルずつ加えた。さらにT4DNAリガーゼ6単位を加え、4℃で18時間結合反応を行った。

該反応液を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、Ap^rのコロニーを得、このコロニーより前記バーンボイムらの方法によりプラスミドDNAを回収し、第43図に示したpCfAB5を得た。前記ディオキシ・シータエンス法でpCfAB5のDNAランカー部分の塩基配列を決定したところ、17番目のアミノ酸をコ

ードするコドンの1番目の塩基はpCfAB5ではAであり、成熟型hG-CSFの17番目のCysが、pCfAB5ではSerに置換していることが判明した。

(5) pCfBA8の造成(第44図参照)：

前項で得たpCfAB5、3kgを4.0kgのY-100凝集液に溶かし、制限酵素AvaiI 5単位とBglII 5単位を加え37℃で1時間消化反応を行った。反応液からLGT法により、トリプトファン・プロモーター部分とEppendorfネーター部分を含む約2.8kbのDNA断片(AvaiI-BglII断片)を約1kg得た。

これとは別に、pCfWD1の8kgを50μgのY-100凝集液に溶かし、制限酵素BglIIを5単位加え、37℃で1時間消化反応を行った。アガロースゲル電気泳動法でBglII切断が完全に行われていることを確認した後に、制限酵素AvaiIを3単位加え、37℃で20分間部分切断反応を行った。反応液からLGT法により、hG-CSF cDNAの大部分を含む約

1.3 KbのDNA断片 (Bgl II - Ava I 断片) を0.4 mg得た。

次に上記で得た pCfABA5 由来の Ava I - Bgl II 断片 (約 2.8 Kb) の 0.1 mg と pCfWD1 由来の Bgl II - Ava I 断片 (約 1.3 Kb) 0.3 mg を T4 DNA リガーゼ緩衝液 2.5 μl に浴かし、3 単位の T4 DNA リガーゼを加え、4℃で 18 時間結合反応を行った。

該反応液を用いて大腸菌 HB101 株を液体培養液に浴かし、Ap⁺ のコロニーを得、このコロニーより前記バーンギムラの方法によりプラスミド DNA を回収し、第44図に示した pCfBA8 を得た。

pCfBA8 のコードする hG-CSF 携帯体のアミノ酸配列は、成熟型 hG-CSF の 6 番目の A1a が Aasn に、17 番目の Cys が Ser に置換している。

④ pCfBD28 の造成 (第44図参照) :

まず、下記の DNA リンカーを合成した。

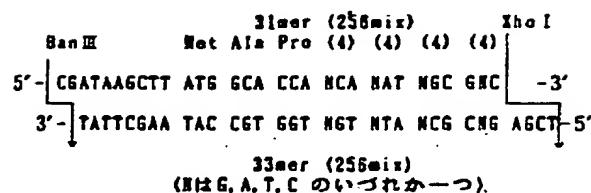
次に pCfBA8 由来の BanIII - Bgl II 断片 (約 2.7 Kb 断片) 0.1 mg、同じく pCfBA8 由来の XbaI - Bgl II 断片 (約 1.4 Kb 断片) 0.1 mg を T4 DNA リガーゼ緩衝液 2.5 μl に浴かし、この混合液に上記 DNA リンカーを約 2 ピコモル加えた。さらに T4 DNA リガーゼ 8 単位を加え、4℃で 18 時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて大腸菌 HB101 株を液体培養液に浴かし、Ap⁺ のコロニーを得た。このコロニーの培養液からプラスミドを回収し、pCfBD28 を得た。前記ディオキシ・シーケンス法で DNA リンカー部分の塩基配列を決定したところ、hG-CSF 携帯体の N 末端側の塩基配列は下記の通りであることが判明した。

pCfBD28

Met Ala Pro Thr Tyr Arg Ala
ATG GCA CCA ACA TAT CGC GGC

pCfBD28 がコードする hG-CSF 携帯体は、それぞれ成熟型 hG-CSF に比べて次



この DNA リンカーは、4ヶ所の塩基が G, A, T, C のうちのいずれかであり、合計 256 種類の DNA リンカーの混合物として得られる。その結果、この DNA リンカーのコードする hG-CSF の N 末端のアミノ酸配列としては 4ヶ所に 4 種類のアミノ酸の可能性があり、全体として 256 種類のアミノ酸配列が可能であるようにデザインされている。

まず一本鎖 DNA、31-mer と 33-mer を通常のトリエステル法により合成した。31-mer および 33-mer の各々 2 μl を全量 40 μl の T4 キナーゼ緩衝液にとかし、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ 30 単位 (宝酒造社製) を加えて、37℃で 60 分間リン酸化反応を行った。

のようにアミノ酸残基が置換されている。

アミノ酸置換の位置 (hG-CSF の 71 位)	プラスミド
	pCfBD28
1 番目 (Thr)	A1a
3 番目 (Leu)	Thr
4 番目 (Gly)	Tyr
5 番目 (Pro)	Arg
17 番目 (Cys)	Ser

pCfBD28 にコードされる hG-CSF 携帯体を hG-CSF (ND28) と呼ぶ。

pCfBD28 を含む大腸菌菌株は *Escherichia coli* C-fBD28 (FERMBP-1479) として微生物に寄託してある。

参考例 17

組換え体プラスミド pTkSR18 の造成：

(1) 組換え体プラスミド pTkSJ1 の造成：

参考例 8 で得られた pTAA4 プラスミド DN A 約 2 μl を 30 μl の Y-0 緩衝液に浴かし、10 単位の EcoRI と 30 単位の BbE1 を

加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、APTT法を用い、約2.8kbのBbcl-EcoRI断片を精製した。別に、pTA4DNA約3μを30μのY-0緩衝液に溶かし、12単位のKpnIを加え37℃で2時間消化反応を行った。続いて、1.5μの2M NaClと1単位のEcoRIを加え、さらに37℃で1時間消化反応を行った。この反応により、DNAはKpnIで完全に、EcoRIで部分的に消化された。65℃、10分間の熱処理後、APTT法を用い、約1.4kbのEcoRI-KpnI断片を精製した。また、下記2種の合成DNA(16塩基と24塩基)をアプライド・バイオシステムズ社380A-DNA合成器を用いて合成し、それぞれ別々に上所述べた方法と同様の方法を用いて5'-リン酸化した。

5'-CTCCCTGCTCCCCATGG-3'

3'-CGCGGAGGGACGGAGGGTACCTTAA-5'

このようにして得られたpTA4由来の約2.8

kbのBbcl-EcoRI断片(約0.1μ)、pTA4由来の約1.4kbのEcoRI-KpnI断片(約0.05μ)および5'-リン酸化された2種の合成DNA(それぞれ1pmoleずつ)を20μのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、50単位のT4DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を挑戦株とし、Ap耐性株を得た。この挑戦株からプラスミドDNA、pTkSJ1を単離し、制限酵素消化による構造解析およびM13ファージを用いたディオキシ・シーケンス法により、pTkSJ1が目的の構造を有することを確認した(第50回参照)。

② 組換え体プラスミドpTkSR18の造成:

上で得られたpTkSJ1プラスミドDNA約3μを30μのY-100緩衝液に溶かし、10単位のXbaIと15単位のScaIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、

10分間の熱処理後、APTT法を用い、約0.5kbのDNA断片を精製した。別に、参考例5-1で得られたpTrS33プラスミドDNA約2μを150mM KClを含むY-0緩衝液に溶かし、8単位のPvuIと15単位のSalIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、APTT法を用い、約1.0kbのDNA断片を精製した。また、参考例6で得られたpTerm2プラスミドDNA約2μを30μのY-150緩衝液に溶かし、8単位のPvuIと8単位のNsiI(New England Biolabs社製)を加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、APTT法を用い、約1.85kbのDNA断片を精製した。また、下記2種の合成DNA(35塩基と31塩基)をアプライド・バイオシステムズ社380A-DNA合成器を用いて合成し、それぞれを別々に上所述べた方法と同様の方法を用いて5'-リン酸化した。

5'-ACTGTGACGTCCTCAGCTGTTCTGAGGAAATGCA-3'
3'-TGACACTGCAGGGGTCGACAAGACTTCCTT-5'

このようにして得られたpTkSJ1由来の約0.5kbのXbaI-ScaI断片(約0.05μ)、pTrS33由来の約1.0kbのPvuI-SalI断片(約0.1μ)、pTerm2由来の約1.85kbのNsiI-PvuI断片(約0.1μ)、および5'-リン酸化された2種の合成DNA(それぞれ1pmoleずつ)を20μのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、50単位のT4DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

このようにして得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を挑戦株とし、Ap耐性株を得た。この挑戦株からプラスミドDNA、pTkSR18を単離し、制限酵素消化による構造解析およびM13ファージを用いたディオキシ・シーケンス法により、pTkSR18が目的の構造を有することを確認した(第51回 参照)。

考例18

pTKSS4の造成:

(1) 組換え体プラスミドpTKSD217の造成:

参考例8で得られたpTA4プラスミドDNA A約10μgを100μgのY-100緩衝液に溶かし、約30単位のXba Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。続いて、フェノール抽出およびクロロホルム抽出を行った後、エタノール沈澱によってDNA断片を回収し、50μlのTE緩衝液[10mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.5mM EDTA]に溶かした。このDNA溶液10μlに、5倍濃度のBAL31緩衝液[100mM Tris-HCl (pH 8.0)、3M NaCl、60mM CaCl₂、80mM MgCl₂、5mM EDTA]を10μl、水を30μl加え、さらに0.5単位のエキソスクレアーゼBAL31(宝酒造社製)を加え、30℃で5分間反応を行った。この反応条件は、Xba I末端から約0.5KbのDNAが削れる条件

I突出末端を削って平坦末端に変えた。反応をフェノール抽出によって止め、クロロホルム抽出を行った後、エタノール沈澱によってDNA断片を回収した。このDNA断片を30μgのY-100緩衝液に溶かし、10単位のBamHIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、APT法を用い、約2.8KbのDNA断片を精製した。

このようにして得られたpTA4由来の約1.5KbのDNA断片(約0.2μg)とpTrS33由来の約2.8KbのDNA断片(約0.1μg)とを、全量20μgのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、50単位のT4DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を忠実転換し、A^r耐性株を得た。この忠実転換株からプラスミドDNA pTKSD217を単離し、制限酵素消化による構造解析を行うとともに、大腸菌トリプトファン・プロモーター(P_{trp})の下流の塩基配列をM

である。この反応をフェノール抽出によって止め、さらにクロロホルム抽出を行った後、エタノール沈澱によりDNA断片を回収した。このDNA断片を30μgのY-100緩衝液に溶かし、10単位のBamHIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、APT法を用い、約1.5KbのDNA断片を精製した。

これとは別に、pTrS33プラスミドDNA(参考例5)約2μgを30μgのY-100緩衝液中で約12単位のSac Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。フェノール抽出とクロロホルム抽出の後、エタノール沈澱によってDNA断片を回収し、全量40μlの50mM Tris-HCl (pH 7.8)、7mM MgCl₂、6mM 2-メルカプトエタノール、0.25mM dATP 0.25mM dCTP、0.25mM dGTPおよび0.25mM dTTPを含む緩衝液(以下、“ポリメラーゼ緩衝液”と略称する)に溶かし、6単位のタレノーア断片(Klenow Pol I)(宝酒造社製)を加え、15℃で1時間反応させ、Sac

I3ファーリーを用いたディデオキシ・シーケンス(dideoxy sequence)法によって決定した。その結果、pTKSD217は目的の構造を有しており、かつ該塩基配列は

Cia I Hind III 179 180 181 182
... AT CGATA AGCTT ATG GAC TGC TAC TTT ...
Net Asp Cys Tyr Phe
... → クランク2(K2)

であることを確認した(第52回参照)。

(2) 組換え体プラスミドpTKSL11の造成:

上で得られたpTKSD217プラスミドDNA約3μgを30μgのY-100緩衝液に溶かし、10単位のHind IIIと15単位のSac Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、APT法を用い、約0.23KbのDNA断片を精製した。次に、参考例5で得られたpTerm2プラスミドDNA A約2μgを30μgのY-100緩衝液に溶かし、10単位のHind IIIと10単位のNhe I(ニュー・イングランド・バイオラブズ社製)を加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、APT法を用い、

約2.8 KbのDNA断片を精製した。また、下記2種の合成DNA(35塩基と31塩基)をアプライド・バイオシステムズ社380A-DNA合成器を用いて合成し、それぞれ別々に上で述べた方法を用いて5'-リン酸化した。

5'-ACTGTGACGTCAGCTGTTCTGAGGAAATGCA-3'
3'-TGACACTGCGAGGGTCTGACAAGACTTCTT-5'

このようにして得られたpTkSD217由来の約0.23KbのDNA断片(約0.01μg)、

pTori2由来の約2.8KbのDNA断片(約0.1μg)、および5'-リン酸化された2種の合成DNA(1ピコモルずつ)を全量20μgのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、300単位のT4DNAリガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNA、pTkSL11を単離し、制限酵素消化による構造解析およびM13ディオキシ・シ

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNA、pTkSS4を単離し、制限酵素消化による構造解析を行ったところ、pTkSS4が、目的の構造を有することを確認した(第54図参照)。

参考例19.

組換え体プラスミドpTG3の造成:

参考例18で得られたpTkSS4プラスミドDNA約2μgを30μgのY-10緩衝液に溶かし、10単位の制限酵素NarI(ニューアイングランド・バイオラブズ社製)を加え、37℃で2時間消化反応を行った。続いて1.0μgの2M NaClと12単位のBamHIを加え、さらに37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約3.3KbのDNA断片を精製した。一方、参考例17で得られたpTksR18プラスミドDNA約3μgを上と同一の反応に供し、65℃、

ークエンス法による塩基配列決定を行ったところ、pTkSL11は目的の構造を有することを確認した(第53図参照)。

(3) 組換え体プラスミドpTkSS4の造成:

参考例1で得られたptpA7プラスミドDNA約2μgを30μgのY-100緩衝液に溶かし、12単位の制限酵素ScaIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約2.0KbのDNA断片を精製した。一方、上で得られたpTkSL11プラスミドDNA約2μgを上と同様の反応に供し、65℃、10分間の熱処理後、AFT法を用いて約2.0KbのDNA断片を精製した。

このようにして得られたptpA7由来の約2.0KbのDNA断片(約0.1μg)とpTkSL11由来の約2.0KbのDNA断片(約0.1μg)を20μgのT4リガーゼ緩衝液に溶かし、T4DNAリガーゼ300単位を加え、4℃で18時間結合反応を行った。

10分間の熱処理後、AFT法を用いて約0.2KbのDNA断片を精製した。

このようにして得られたpTkSS4由来の約3.3KbのDNA断片(約0.1μg)とpTksR18由来の約2.0KbのDNA断片(約0.01μg)を20μgのT4リガーゼ100単位を加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて、大腸菌MM294株を形質転換し、Ap耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNA、pTG3を単離し、制限酵素消化による構造解析を行ったところ、pTG3が目的の構造を有することを確認した(第55図参照)。

参考例20.

組換え体プラスミドptpA2の造成:

参考例19で得られたpTG3プラスミドDNA約2μgをY-100緩衝液30μgに溶かし、10単位のEcoRIとPvuIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分

間の熱処理後、ATF法を用いて約1.7 KbのDNA断片を精製した。

また、考例12で得られたpUKB101プラスミドDNA約2.8KbをY-100酸新波30℃に挿かし、10単位のHincIとPvuIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、ATF法を用いて約3.0 KbのDNA断片を精製した。

さらに、参考例17で得られたpTKSR18プラスミドDNA約2.8KbをY-100酸新波30℃に挿かし、10単位のHindIIIとAatIIを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、ATF法を用いて約0.55 KbのDNA断片を精製した。

また、下記4種の合成DNA(37塩基と41塩基および41塩基と45塩基)をアブライド・バイオシステムズ社380A・DNA合成機を用いて合成した。

5'-CCCCAGCTGTTCTGAAGGAAATATGACTGCTATGAG-3'
(37塩基)
3'-TGCAAGGGTCGACAAGACTTCCTTTATCACTGACGATACTC-5'
(41塩基)

5'-GGGAATGGTCACTTTACCGAGGAAAGGCCAGCACTGACAC-3'
(41塩基)
3'-CCCTTACCACTGAAAATGGCTCCCTTCGGTCGTGACTGGTAC-5'
(45塩基)

これらの合成DNAを20ピコモル(pmoles)ずつ別々に、20μlのT4キナーゼ酸新波中で5単位のT4DNAキナーゼ(宝酒造社製)を加え、37℃で30分間反応させることにより、合成DNAの5'末端をリン酸化した。

このようにして得られたpTG3由来の約1.7 KbのDNA断片(約0.05μg)、pUKB101由来の約3.0 KbのDNA断片(約0.05μg)、pTKSR18由来の約0.55 KbのDNA断片(約0.05μg)、および5'リン酸化された4種の合成DNA(1ピコモルずつ)を全量20μlのT4リガーゼ酸新波に挿かし300単位のT4リガーゼを加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた粗換体プラスミドの混合物を用い

て、大腸菌MM294株を形質転換し、A+耐性株を得た。この形質転換株からプラスミドDNA、pHPA2を単離し、制限酵素消化による構造解析およびM13ディディオキシ・シーケンス法による塩基配列決定を行ったところ、pHPA2は目的の構造を有することを確認した(第5.6図参照)。

発明の効果

本発明によればプロテアーゼ抵抗性、熱安定性などの性質を付与したポリペプチドが粗換体DNA法により工業的に供給される。

4図の簡単な説明

第1図は、N-グリコシド結合型糖鎖の分類を示す。

図中記号はそれぞれ下記物質を示す(以下同じ)。

Glc:グルコース、Man:マンノース、

GlcNAc:N-アセチルグルコサミン、

Gal:ガラクトース、Sia:シアル酸、

Fuc:フコース

第2図は、リビド中間の構造を示す。

図中PPはピロリン酸を示す。

第3図は、ドリコールリン酸サクタルを示す。

図中記号はそれぞれ下記物質を示す。

P~~~:ドリコール酸、P-P~~~:ドリコ

ルピロリン酸、GDP:グアニジン二リン酸、

UDP:ウリジン二リン酸、◆:グルコース、

△:マンノース、●:N-アセチルグルコサミン

第4図は、N-グリコシド結合型糖鎖の生合成系を示す。

図中記号はそれぞれ下記物質を示す。

■:N-アセチルグルコサミン、○:マンノース、

●:ガラクトース、◆:シアル酸、△:グルコ

ス、△:フコース

第5図は、プラスミドpASN2の造成工程を示す。

第6図はプラスミドpASN6の造成工程を示す。

第7図(1)図はプラスミドp198028CH145の造成工程を示す。

第7図(2)図はプラスミドpASN145の造成工

種を示す。

第8(1)図は、大鼠由で生産、精製したhG-CSFおよびhG-CSF [ND28]とCHO細胞で生産させたhG-CSF、hG-CSF [ND28]、hG-CSF [ND28N6]およびhG-CSF [ND28N145]をSDS-ボリアクリルアミド電気泳動に供した後、銀染色したものである。

第8(2)図は、第8(1)図に示したゲル上の蛋白質をニトロセルロース膜に移した後、抗hG-CSF单クローニ抗体を用いて酵素抗体染色を行ったものである。

第8(3)図は、第8(2)図の模式図である。

第8(4)図は、hG-CSF [ND28]について、O-グリコシド結合型糖鎖が新たに付加したものと、そうでないものについてキモトリプシン抵抗性を調べたときのSDS-ボリアクリルアミド電気泳動の結果とその模式図を示す。

第8(5)図は、hG-CSF [ND28N8]について、N-グリコシド結合型糖鎖が新たに付加

示す。

第11図はプラスミドpSE1UKS1-1dの造成工程を示す。

第12図は天然型pro-UKとUK構導体UK-S1のトロンビン感受性を比較したSDS-ボリアクリルアミド電気泳動の結果を示す。

第13図は天然型pro-UKとUK構導体UK-S1のトロンビン感受性をアミドリティック活性で比較した結果を示すグラフである。

第14図(1)と(2)は、オカナガ・バーグ法によるcDNA合成と該DNAを含む組換え体プラスミドの造成工程を示す。

第15図はプラスミドpCCK1の造成工程を示す。

第16図はプラスミドpCCK2の造成工程を示す。

第17図はヒトpro-UK cDNAを運ぶプラスミドpUK11の造成工程を示す。

第18図はプラスミドpTrS20の造成工程を示す。

したものと、そうでないものについてキモトリプシン抵抗性を調べたときのSDS-ボリアクリルアミド電気泳動の結果とその模式図を示す。

第8(6)図は、hG-CSF [ND28N145]について、O-グリコシド結合型糖鎖あるいはN-グリコシド結合型糖鎖が新たに付加したものとそうでないものについてキモトリプシン抵抗性を調べたときのSDS-ボリアクリルアミド電気泳動の結果とその模式図を示す。

第8(7)図は、hG-CSF [ND28N8]についてN-グリコシド結合型糖鎖が新たに付加したものと、それを除去したものについて熱安定性を比較したものである。○印はN-グリカナーゼ処理(N-グリコシド結合型糖鎖除去hG-CSF [ND28N8])を、●印は対照(N-グリコシド結合型糖鎖付加hG-CSF [ND28N8])を示す。

第9図は1本組pUKmpS1の造成工程を示す。

第10図はプラスミドpUKS1の造成工程を

示す。

第19図はプラスミドpTrS33の造成工程を示す。

第20図はプラスミドpTerm2の造成工程を示す。

第21図はプラスミドpTSP10の造成工程を示す。

第22図はプラスミドpTA4の造成工程を示す。

第23図はプラスミドpPAGE105Mの造成工程を示す。

第24図はプラスミドpPAGE106の造成工程を示す。

第25図はプラスミドpSE1PA1-5の造成工程を示す。

第26図はプラスミドpSE1PA1-9の造成工程を示す。

第27図はプラスミドpUC19Hの造成工程を示す。

第28図はプラスミドpSE1PA1-8Aの造成工程を示す。

第29図はプラスミドpSE1PAISE1dbfr1-9Aの造成工程を示す。

第30図はプラスミドpSE1GC3-3の造成工程を示す。

第31図はプラスミドpAS3-3の造成工程を示す。

第32図はプラスミドpUKA2の造成工程を示す。

第33図はプラスミドpUKB101の造成工程を示す。

第34図はプラスミドpUKF2の造成工程を示す。

第35図はプラスミドpUKFproの造成工程を示す。

第36図はプラスミドpSE1UKpro1-1Aの造成工程を示す。

第37図はプラスミドpLA1の造成工程を示す。

第38図はプラスミドpLSA1の造成工程を示す。

第48図はプラスミドpSEUKS3の造成工程を示す。

第49図は天然型pro-UKおよび糖鎖付加型修飾UK-S3の70℃における熱失活曲線を示す。

第50図はプラスミドpTKSJ1の造成工程を示す。

第51図はプラスミドpTKSR18の造成工程を示す。

第52図はプラスミドpTKSD217の造成工程を示す。

第53図はプラスミドpTKSL11の造成工程を示す。

第54図はプラスミドpTKSS4の造成工程を示す。

第55図はプラスミドTG3の造成工程を示す。

第56図はプラスミドpHPA2の造成工程を示す。

第39図はプラスミドpCfITA1の造成工程を示す。

第40図はプラスミドpCfTB20の造成工程を示す。

第41図はプラスミドpCfTL38の造成工程を示す。

第42図はプラスミドpCfWD1の造成工程を示す。

第43図はプラスミドpCfT95K19、pCfAA1およびpCfAB5の造成工程を示す。

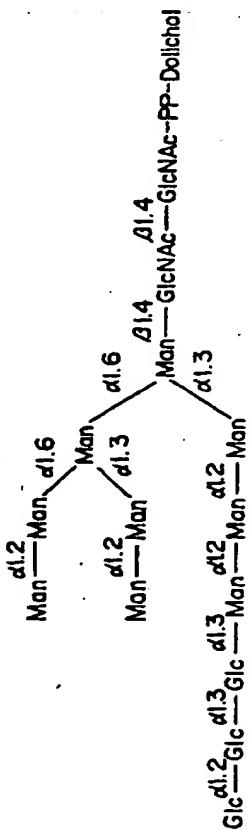
第44図はプラスミドpCfBA8およびpCfBD28の造成工程を示す。

第45図は天然型pro-UKおよび糖鎖付加型修飾UK-S1の持続注入における全身糖倍系因子のレベルの時間的変化を示す。

第46図は天然型pro-UKおよび糖鎖付加型修飾UK-S1の急速静注における全身糖倍系因子のレベルの時間的変化を示す。

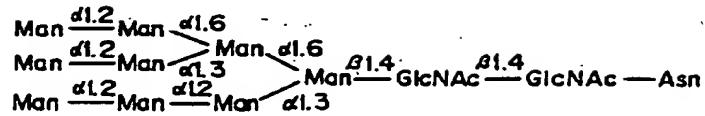
第47図のプラスミドpUKS3の造成工程を示す。

第2図

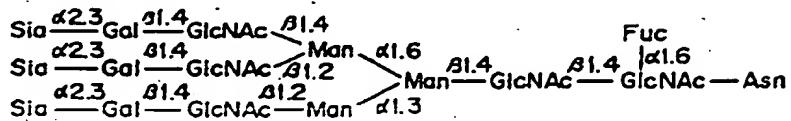


第 1 図

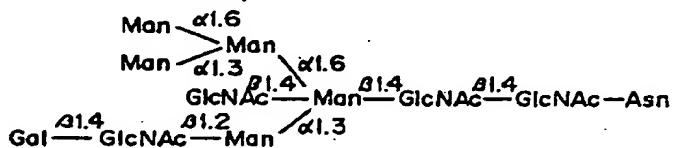
高マンノース型 (代表例)



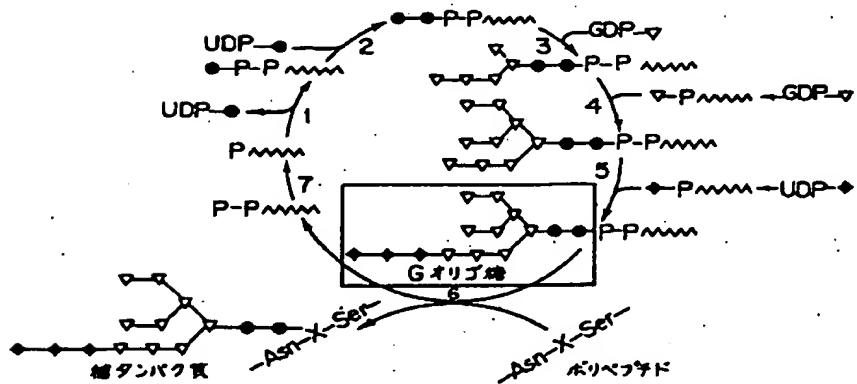
複合型 (代表例)



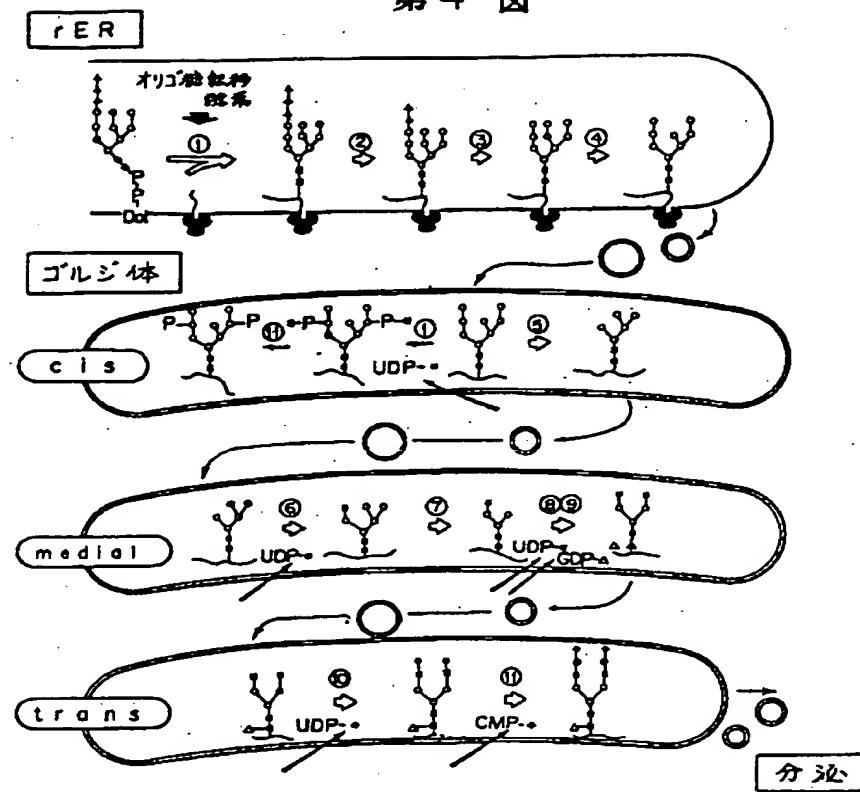
バイブリッド型 (代表例)



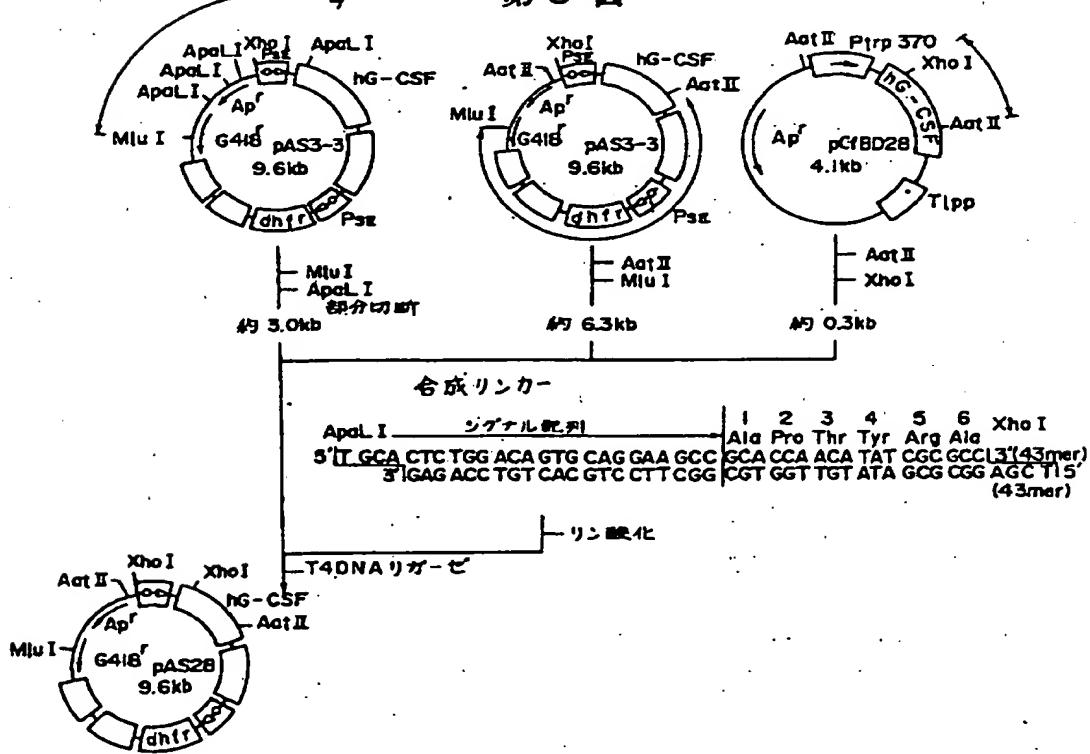
第 3 図

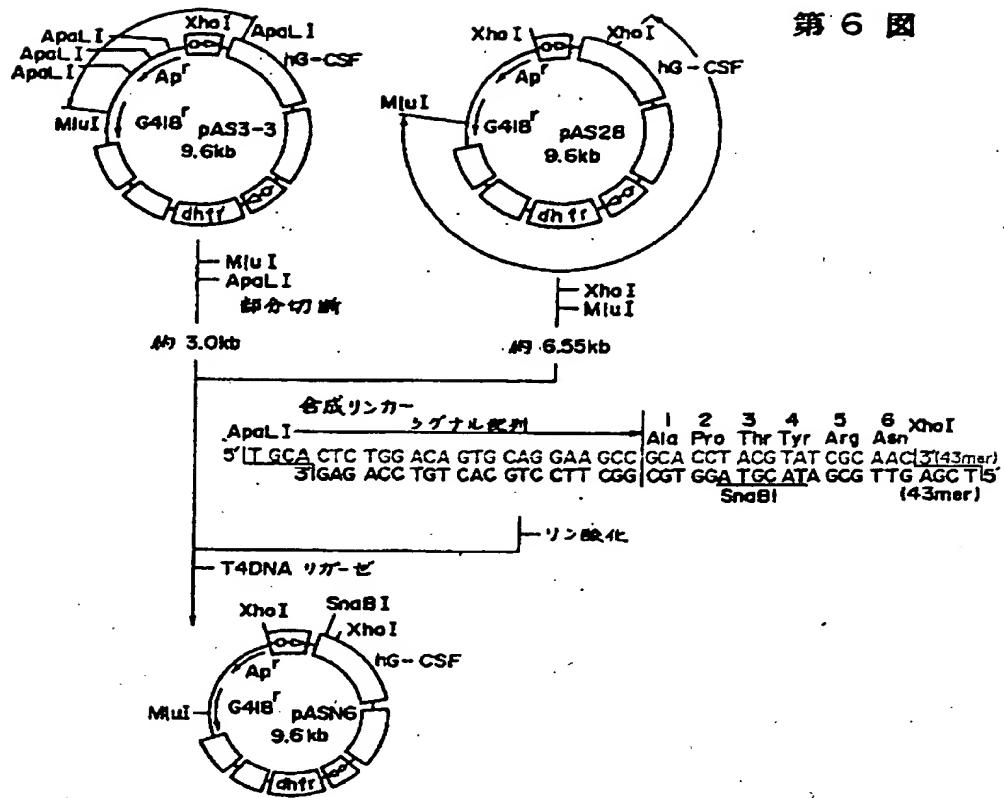


第4図

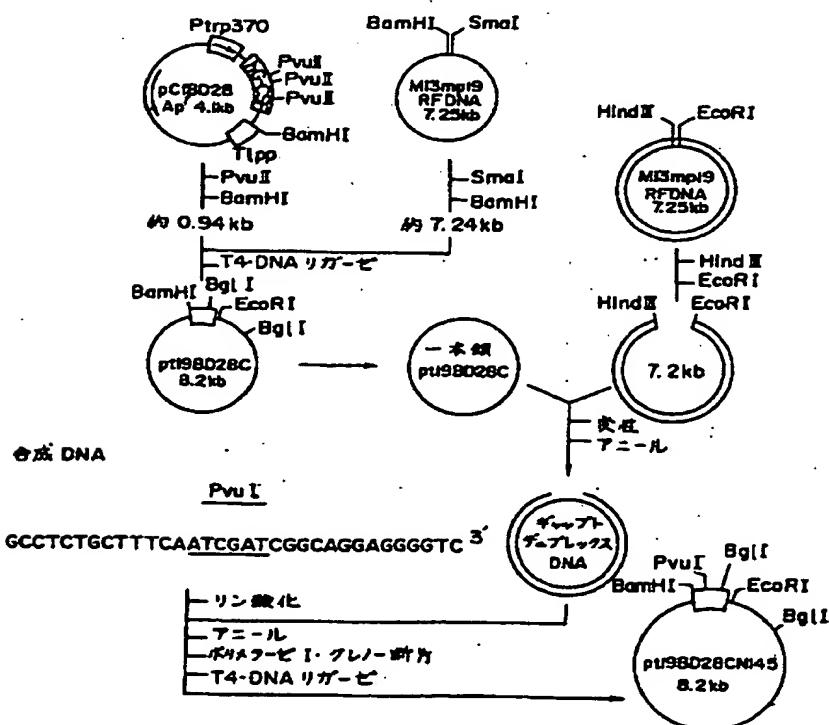


第5図

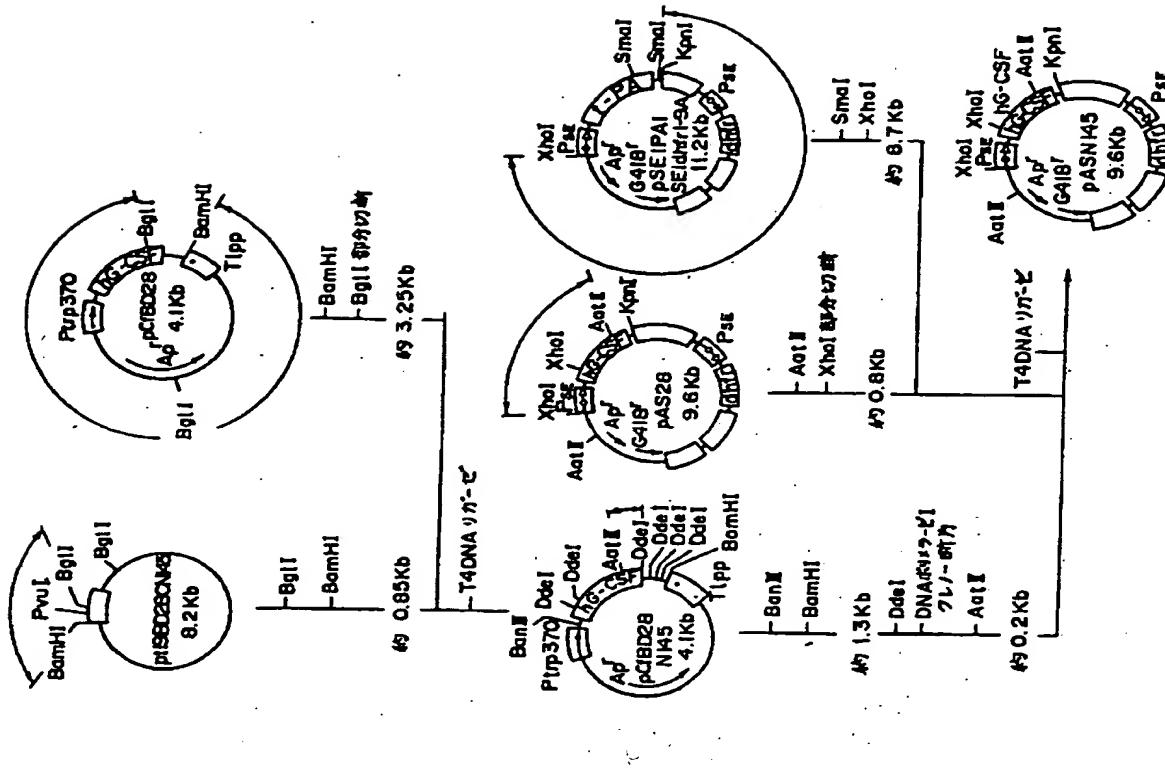




第70) 図



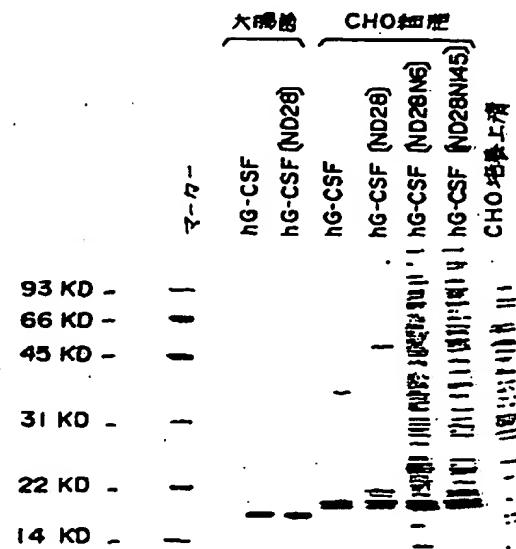
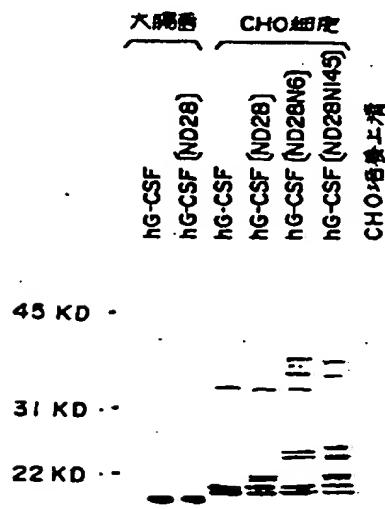
第7(2)回



画面の浮き(内容に変更なし)

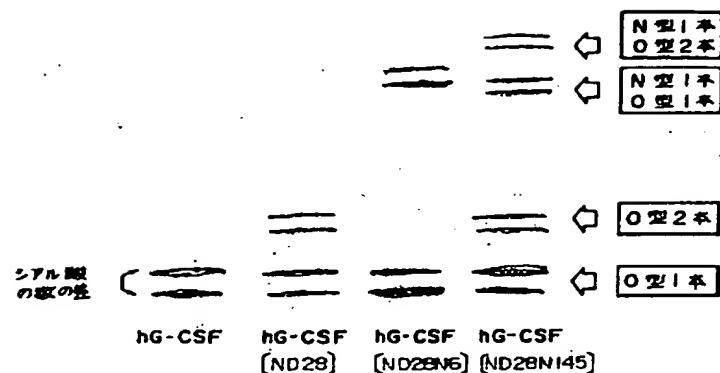
第8(2)圖

第8(1)図

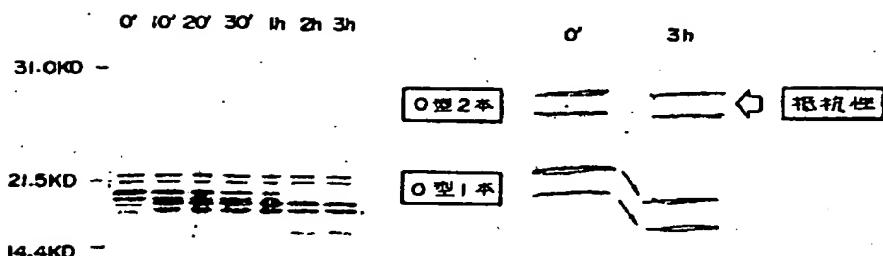


図面の浮遊(内容に変更なし)

第8(3)図

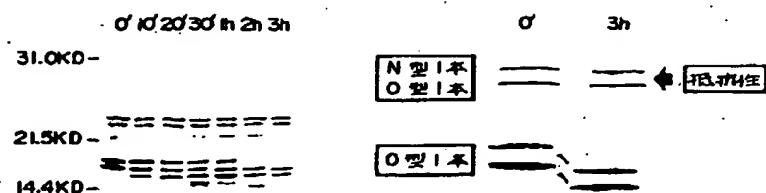


第8(4)図

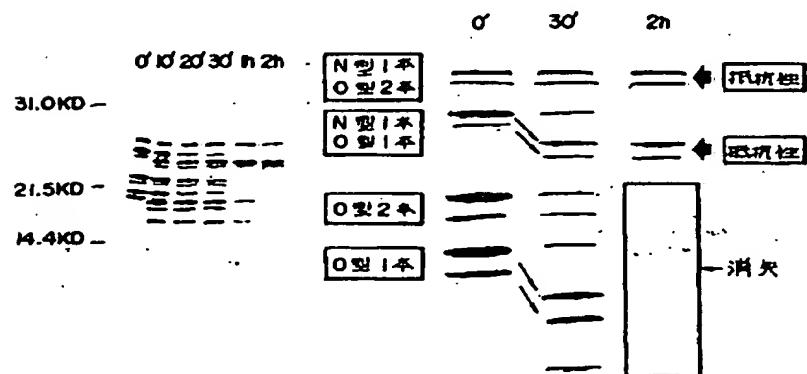


図面の浮遊(内容に変更なし)

第8(5)図

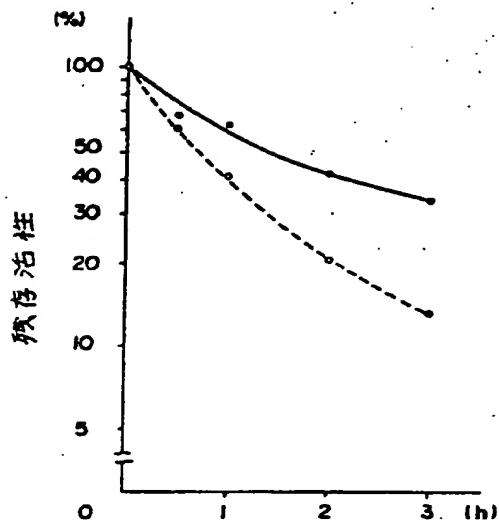


第8(6)図

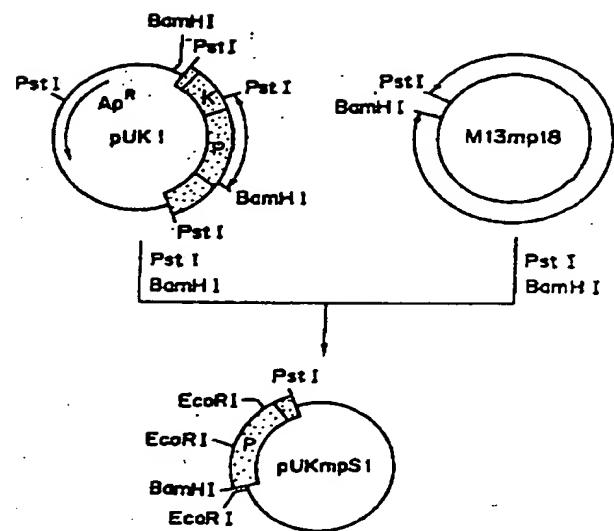


画面の浮き(内容に変更なし)

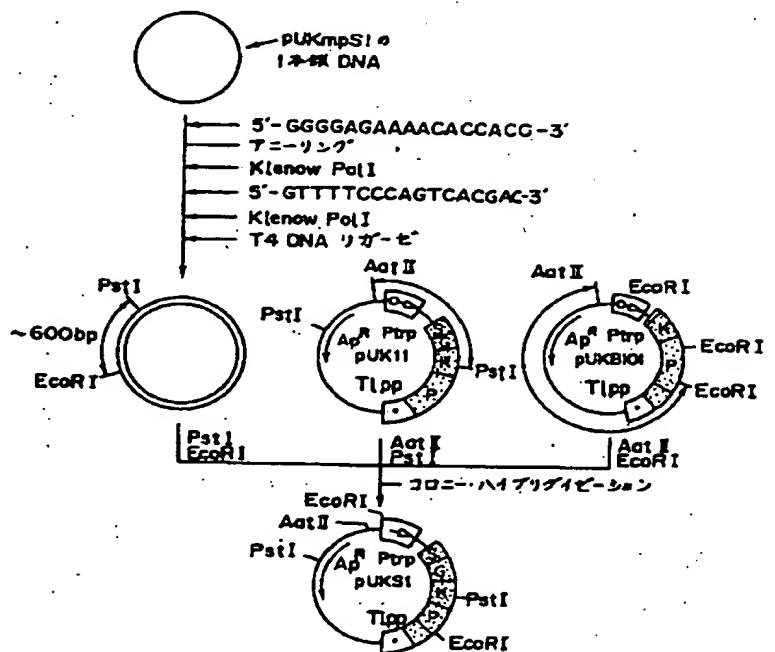
第8(7)図



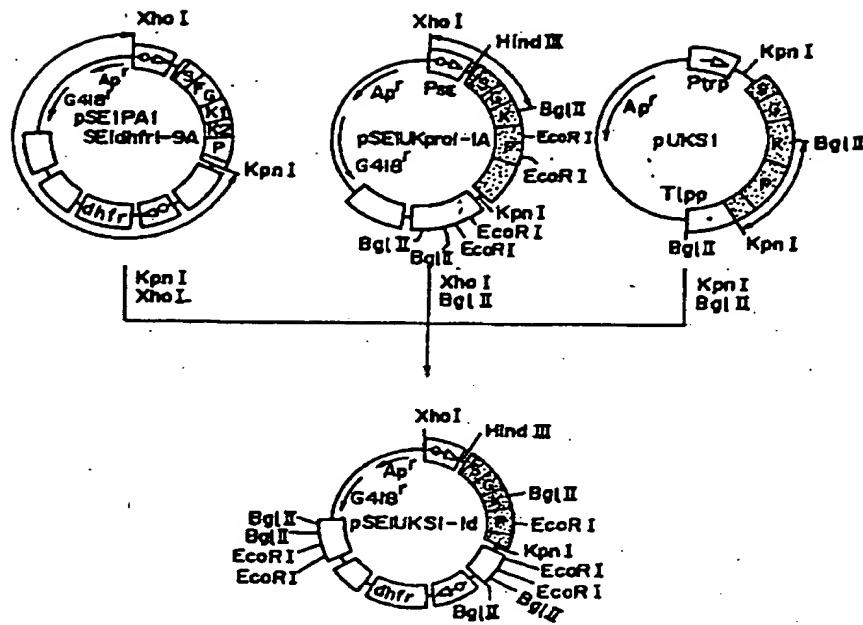
第9図



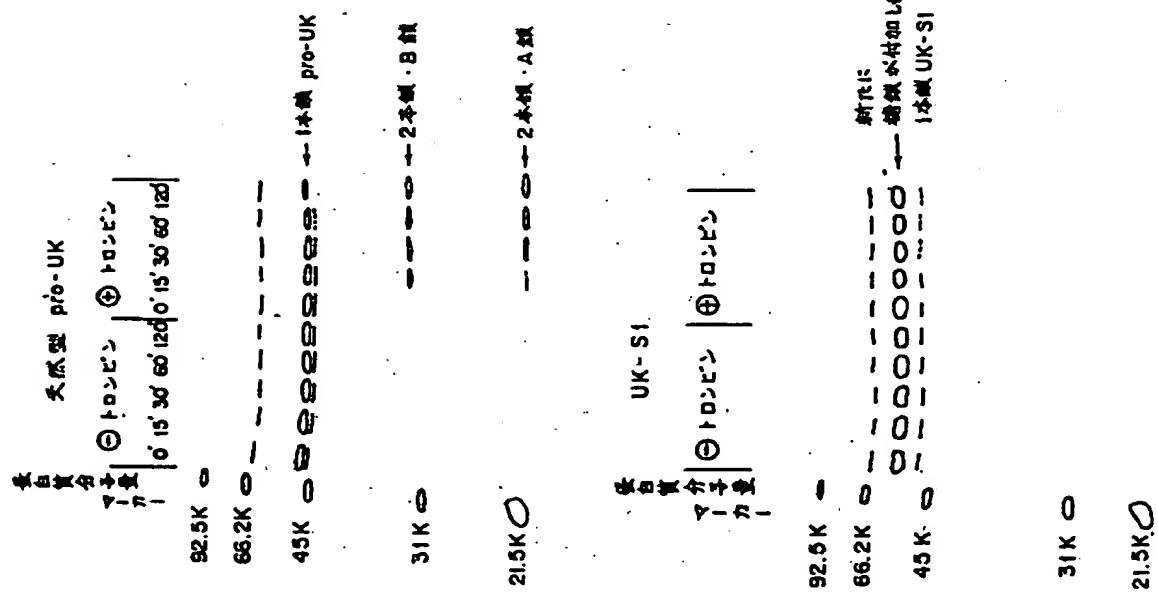
第10図



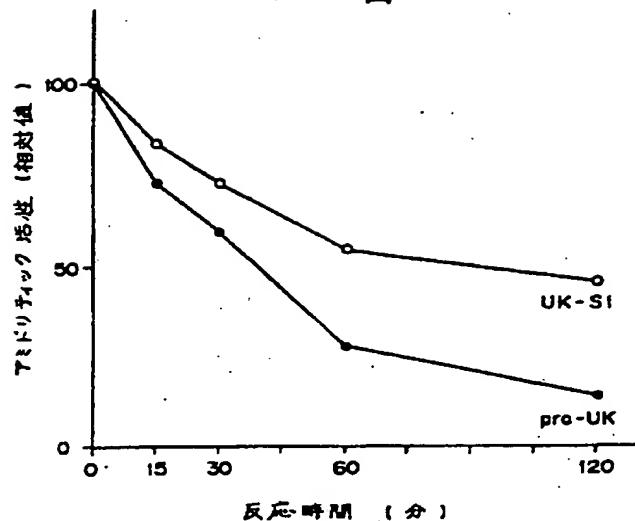
第11図



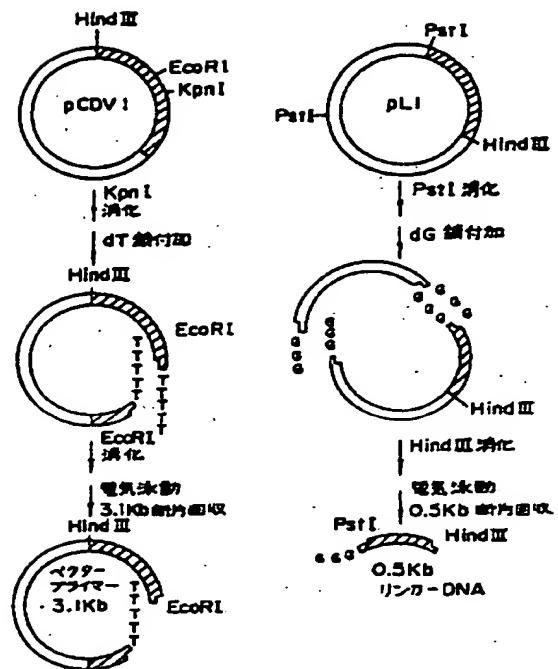
第12図



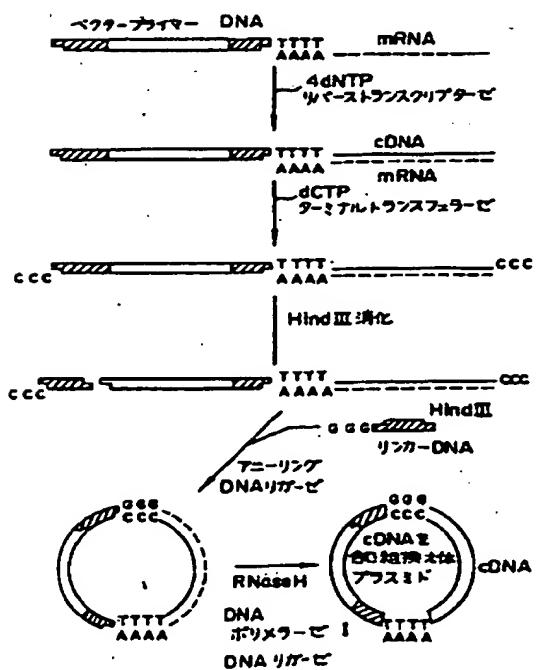
第13図



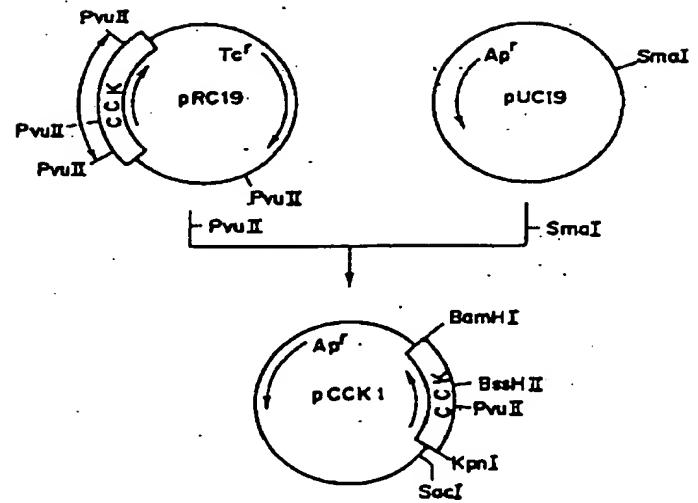
第14図(1)



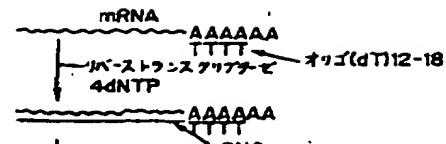
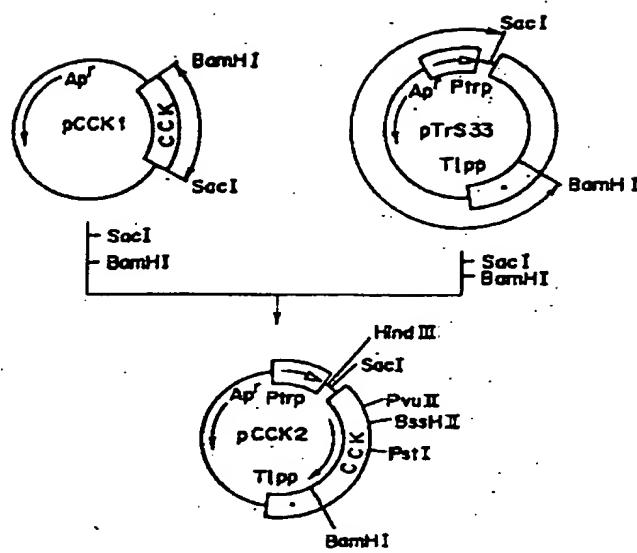
第14図(2)



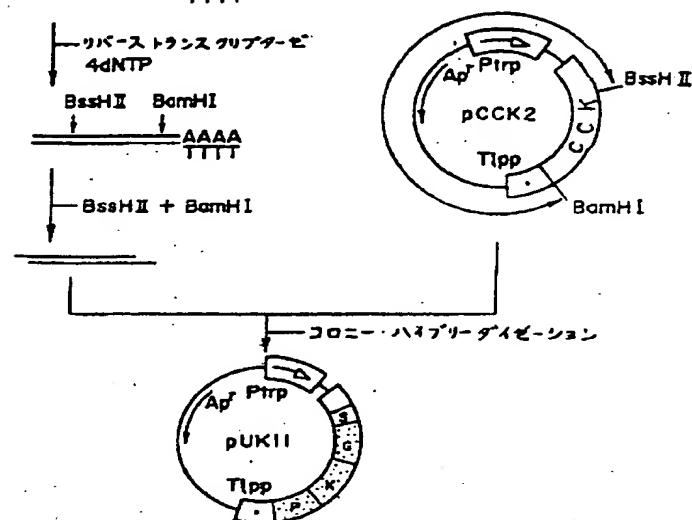
第15図



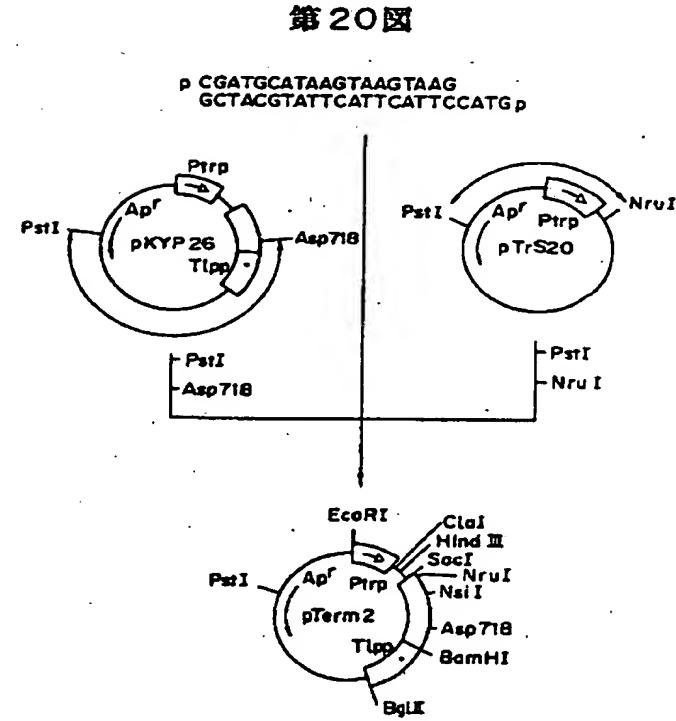
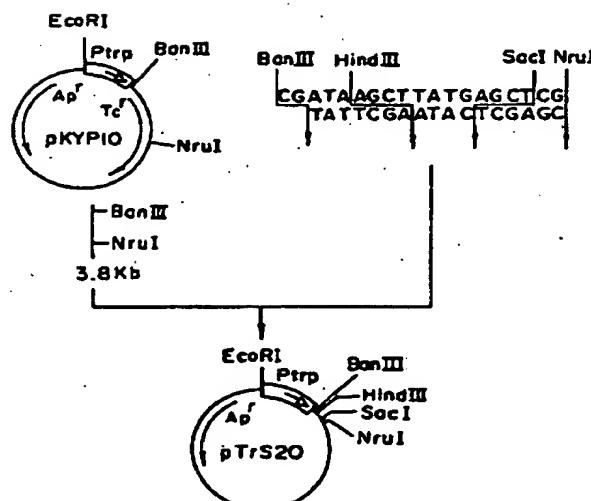
第16図



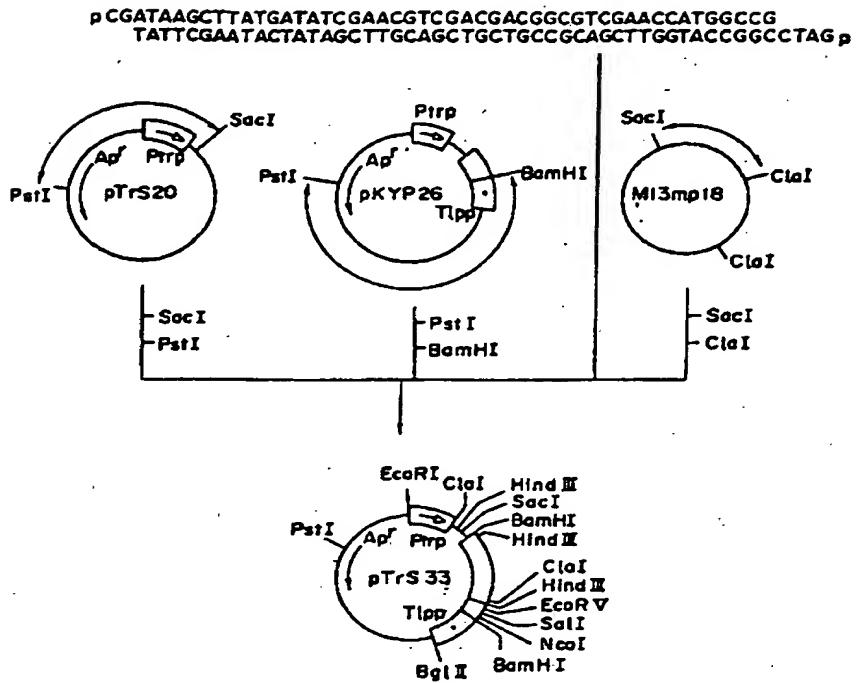
第17図



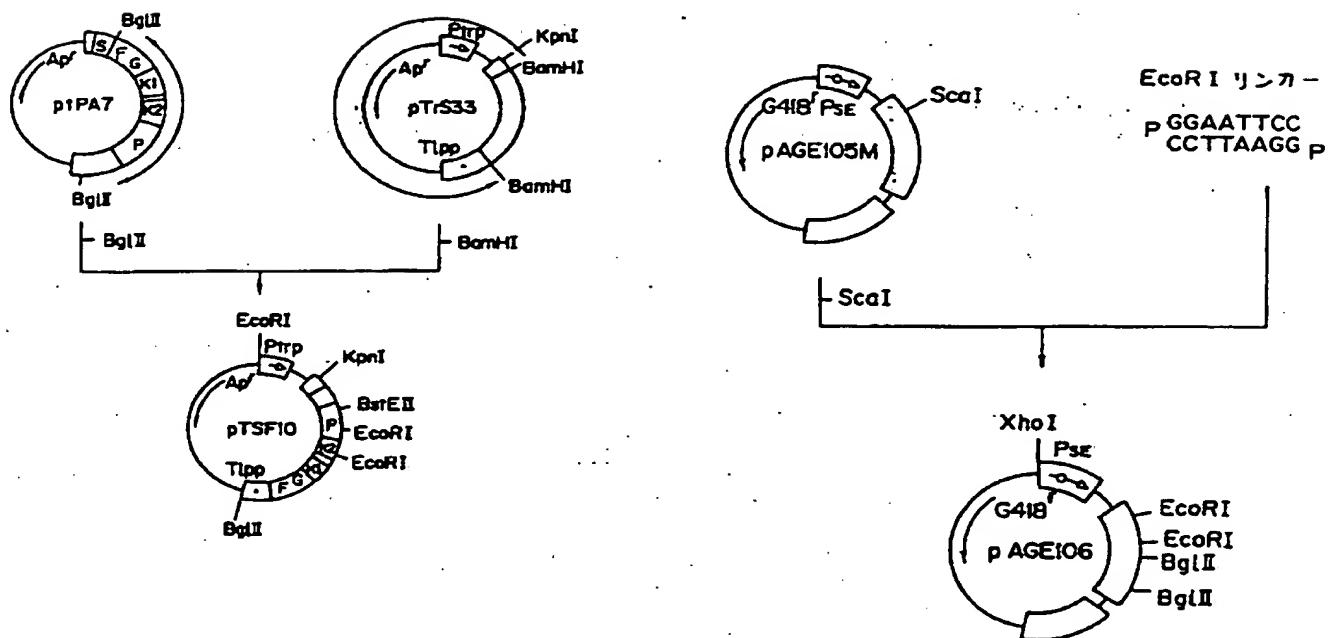
第18図



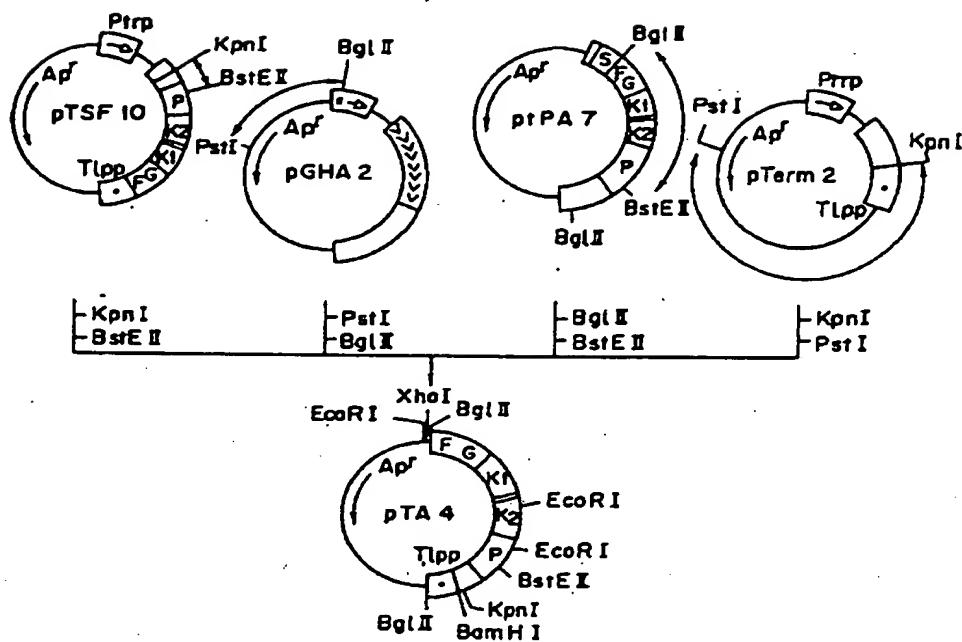
第19図



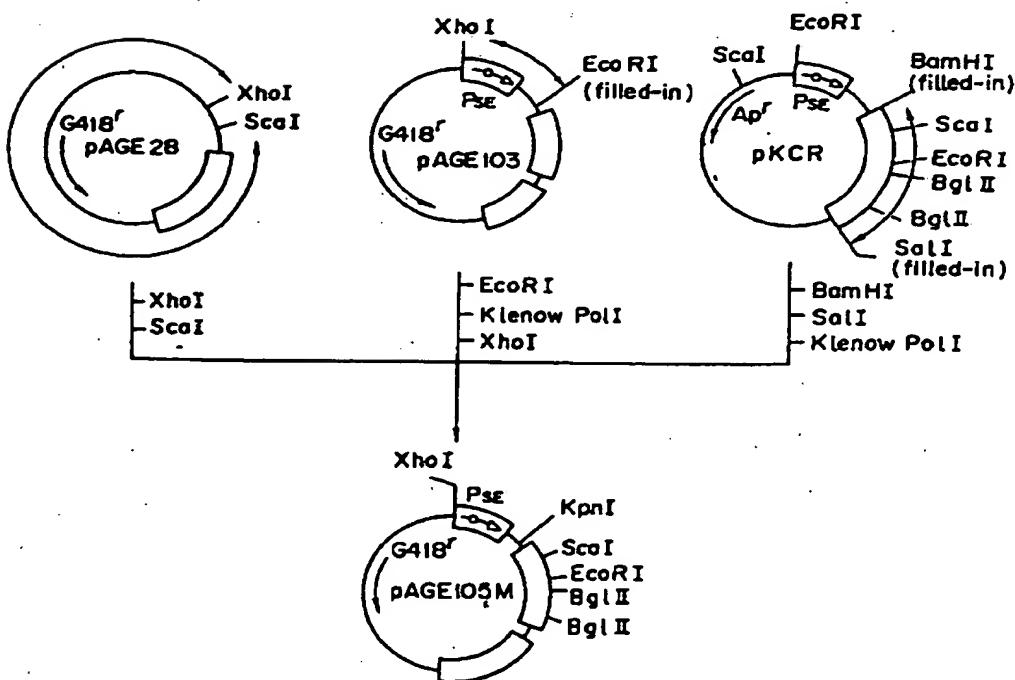
第21図



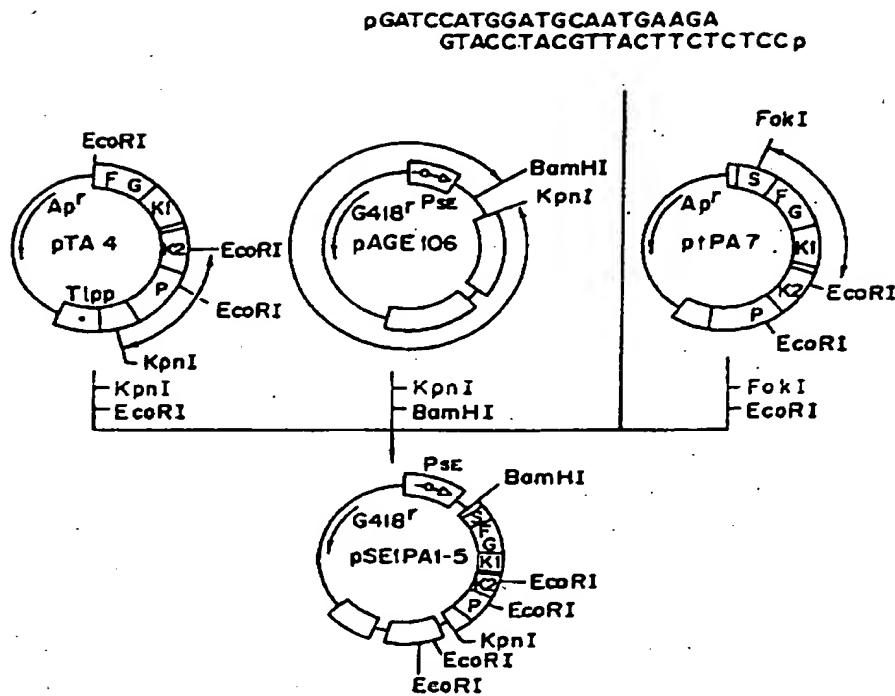
第22圖



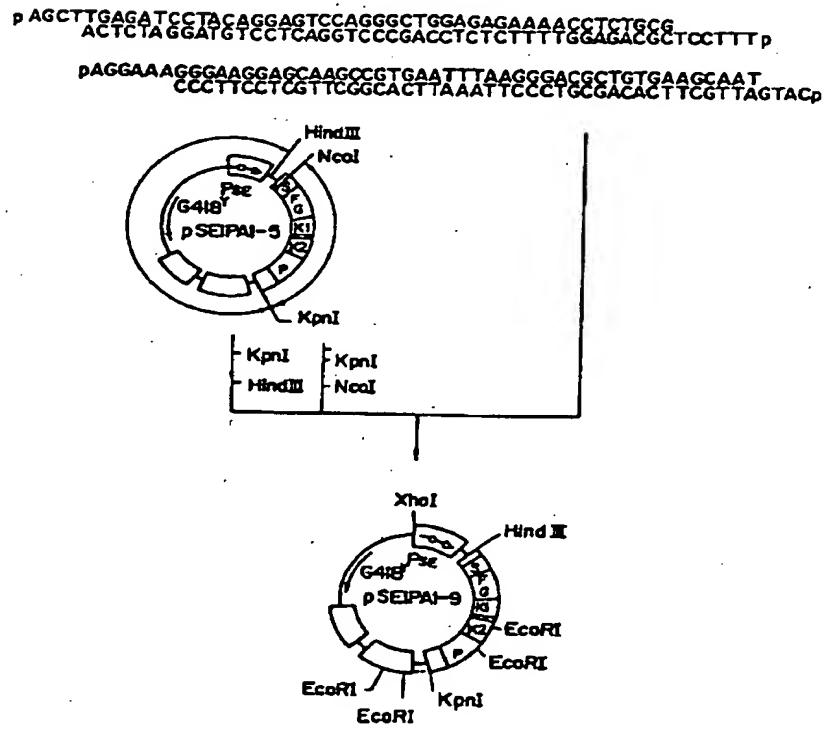
第23 図



第25図

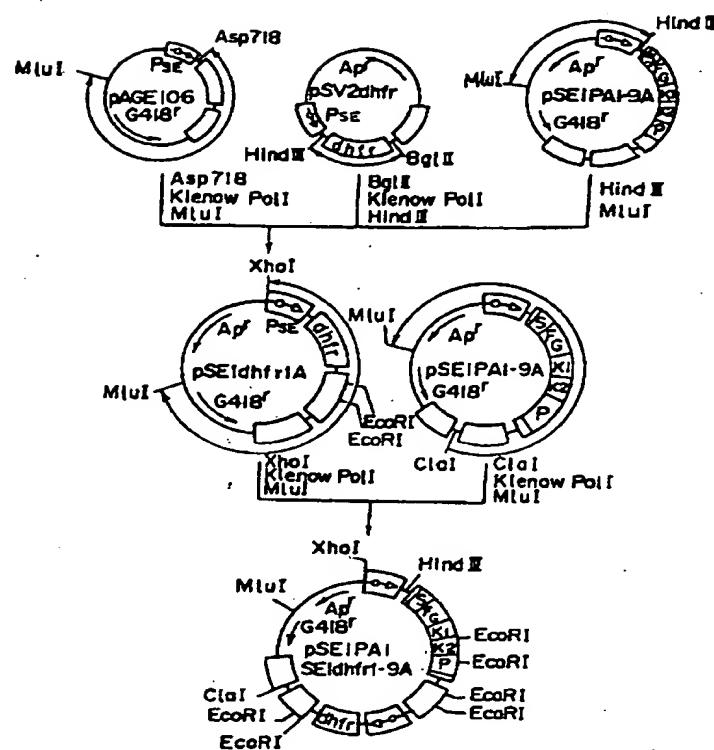
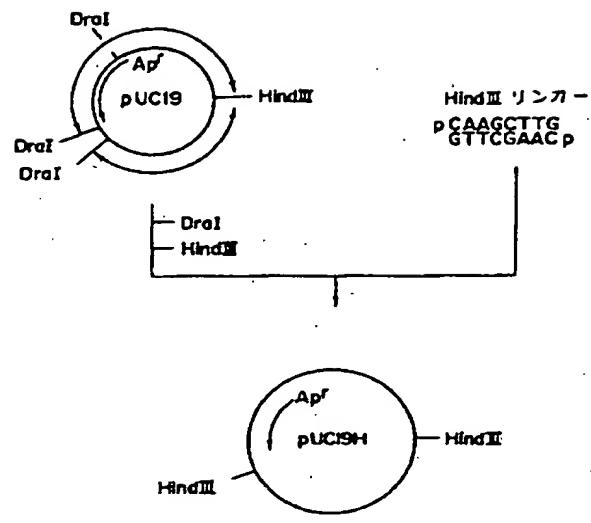


第26図

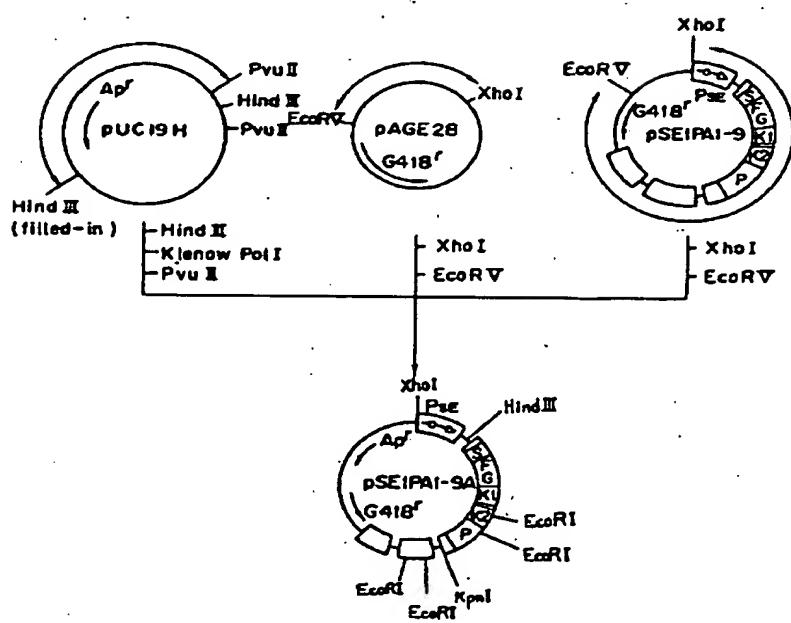


第29図

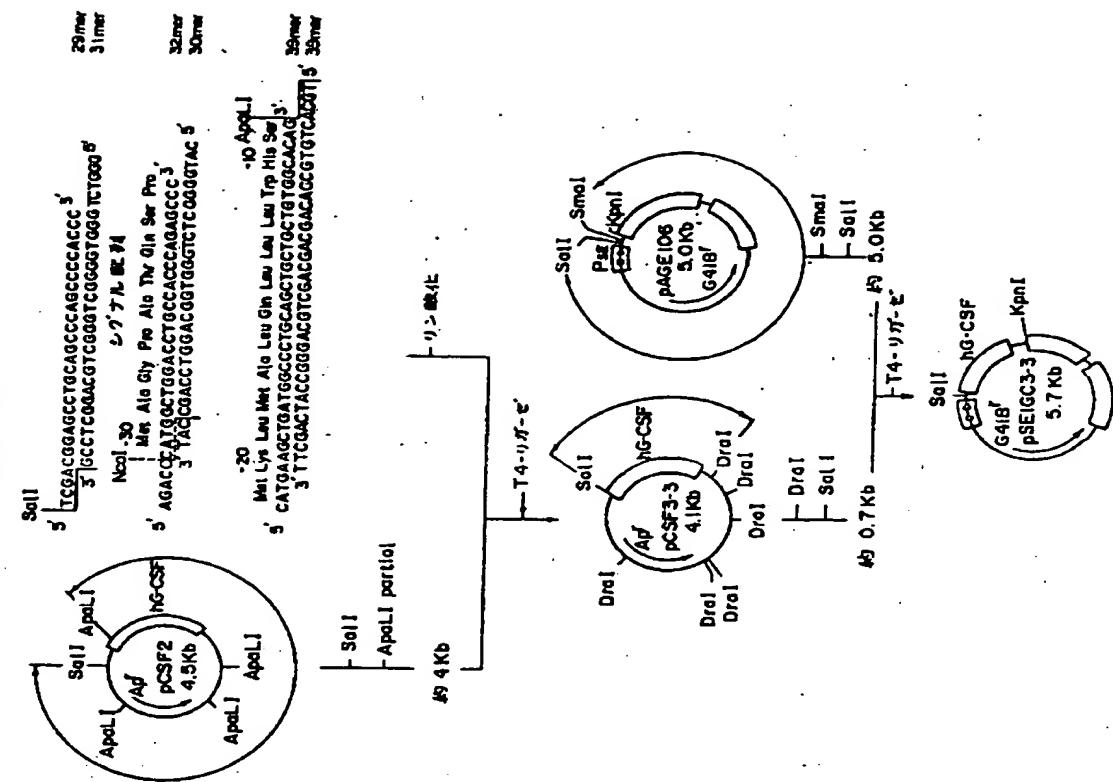
第27図



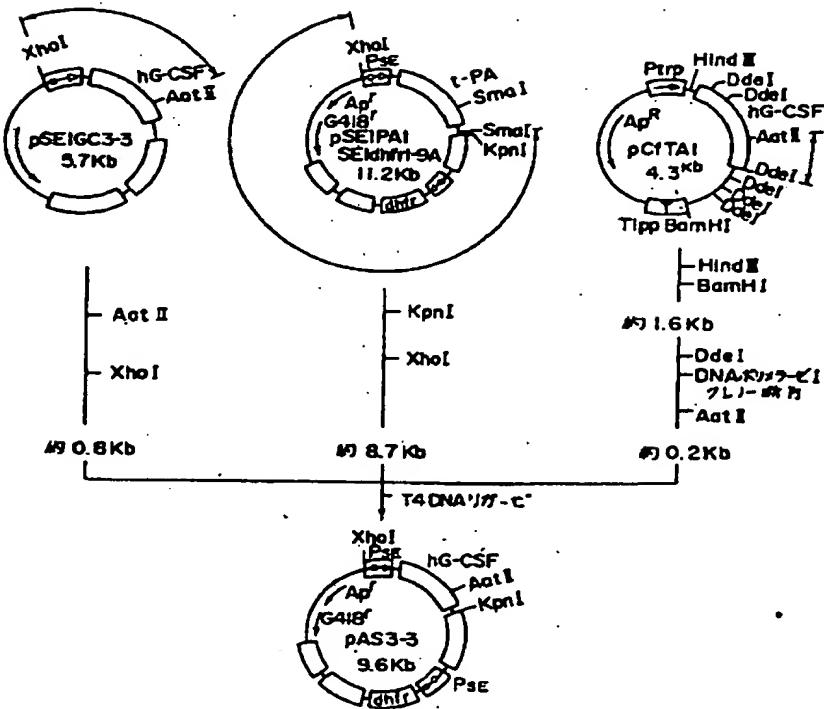
第28図



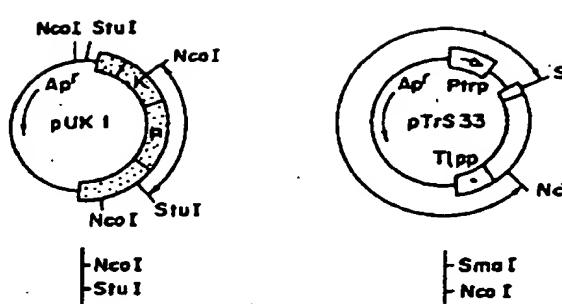
第30回



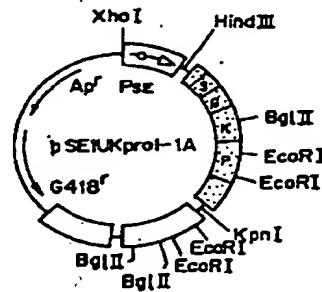
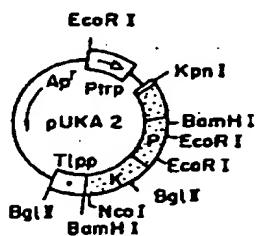
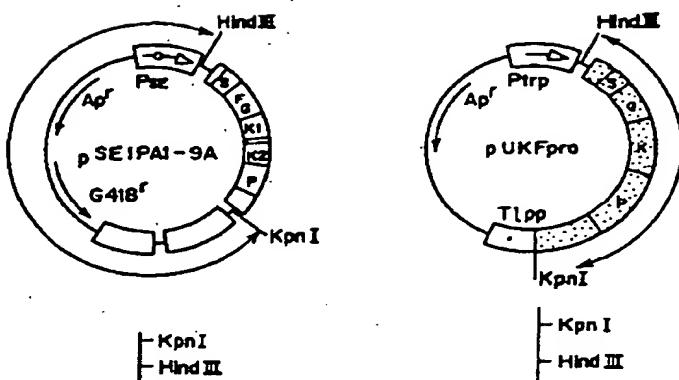
第31圖



第32図

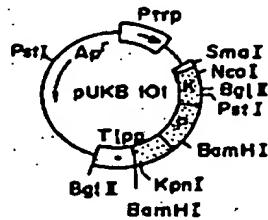
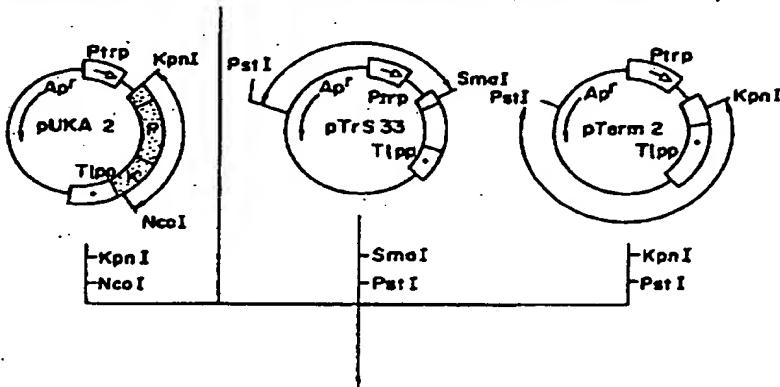


第36図

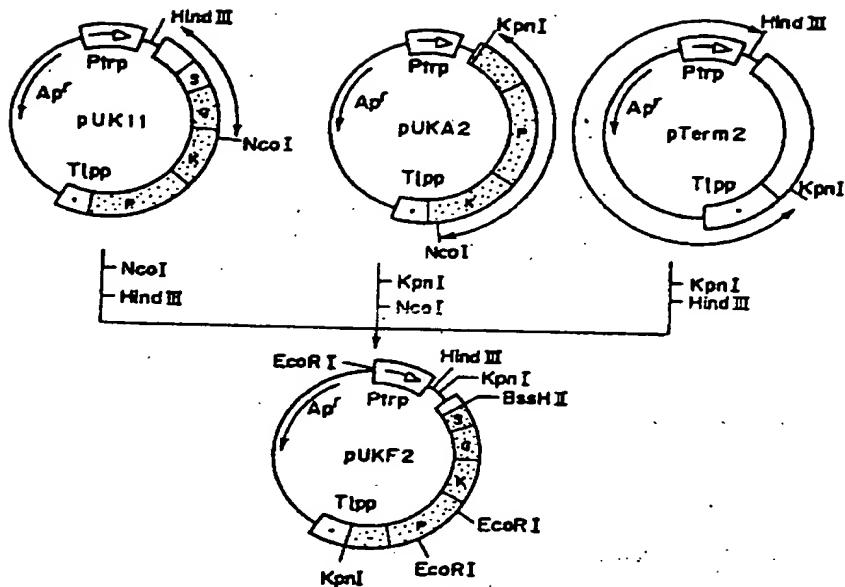


第33図

P GGG AAT GGT CAC TTT TAC CGA GGA AAG GCC AGC ACT GAC AC
CCC TTA CCA GTG AAA ATG GCT CCT TTC CGG TCG TGA CTG TG GTA Cp

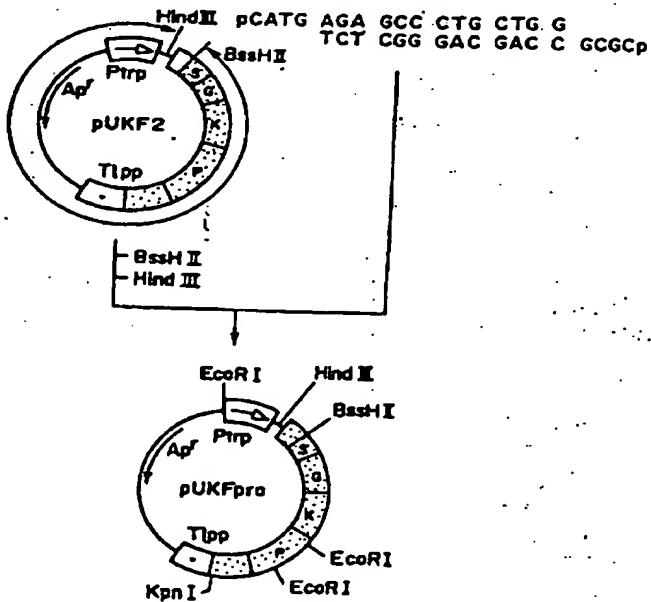


第34図

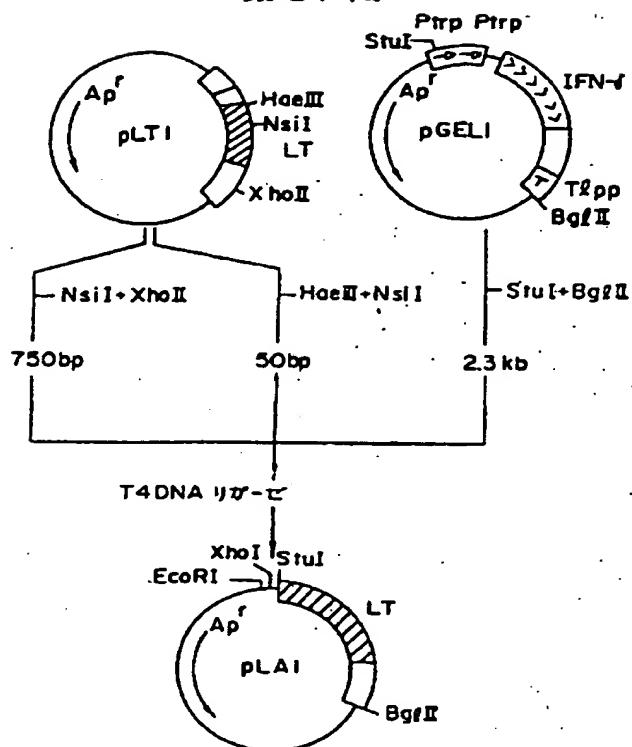


第35図

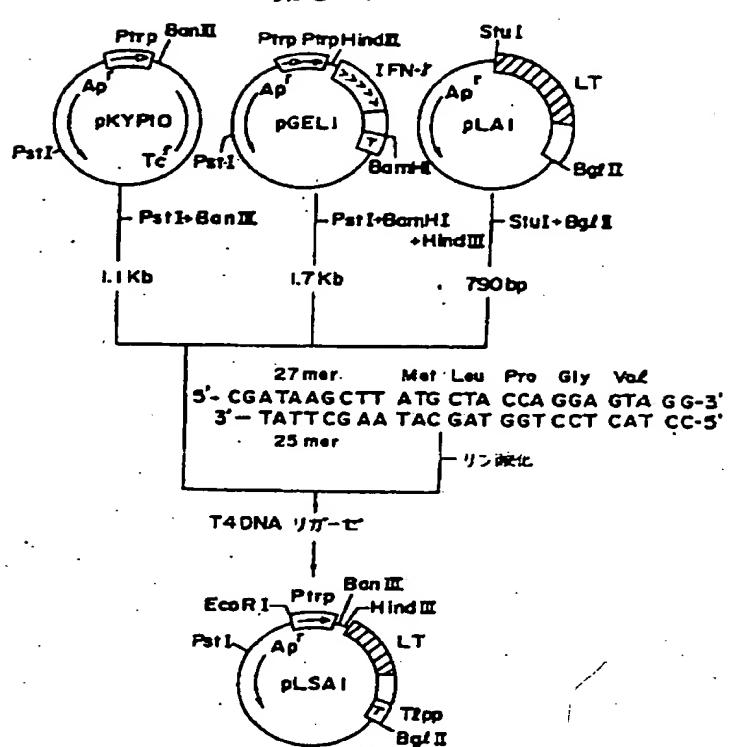
pAGCTTGTCCTCGAGGCCGTCGCCGCTCTTGCCGCAG
 ACAGGGGGCGTCCGGCAAGCGCGGGAGGACGGCGTCCGGTGGp
 pGCCACCGAGGCCGCCGTCTAGCGCCCCGACCTCGCCAC
 CTCCGGCGCGCAGATCGCGGGCTGGAGCGGGTGGTACp



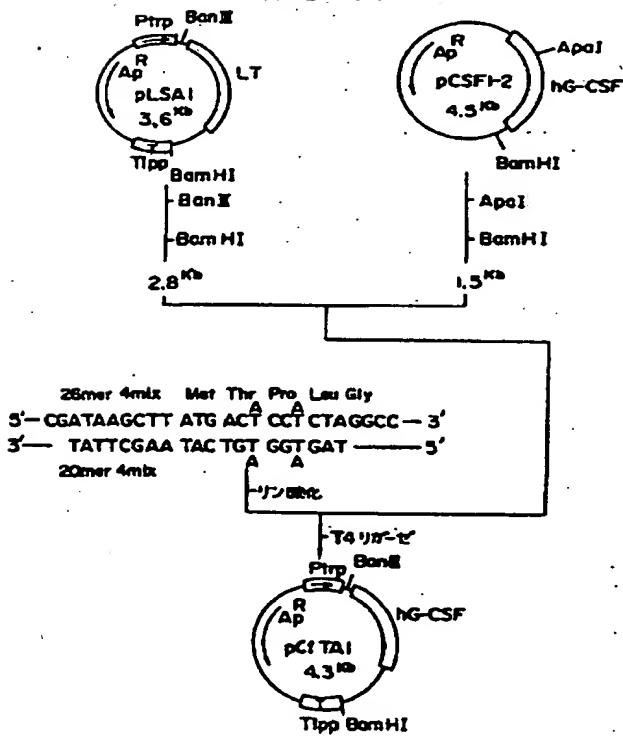
第37図



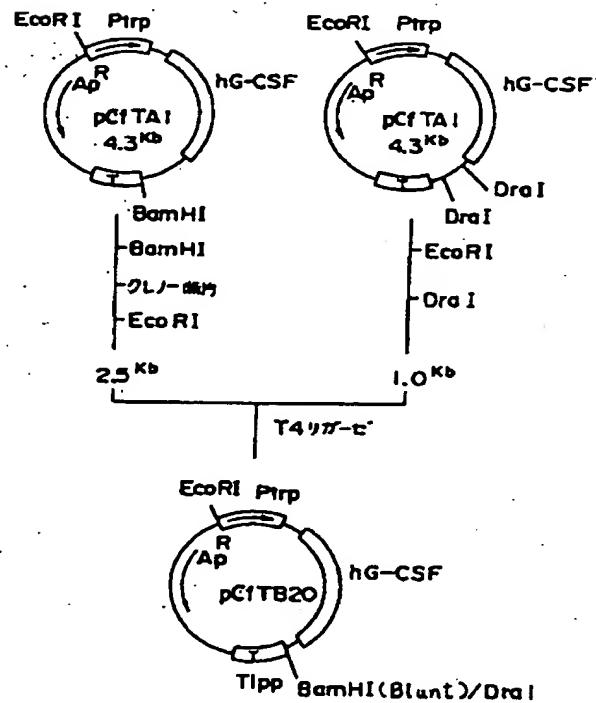
第38図



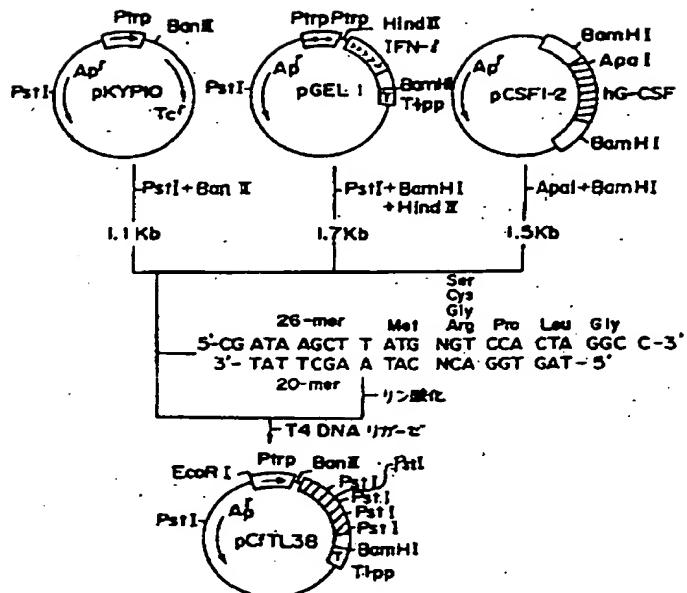
第39図



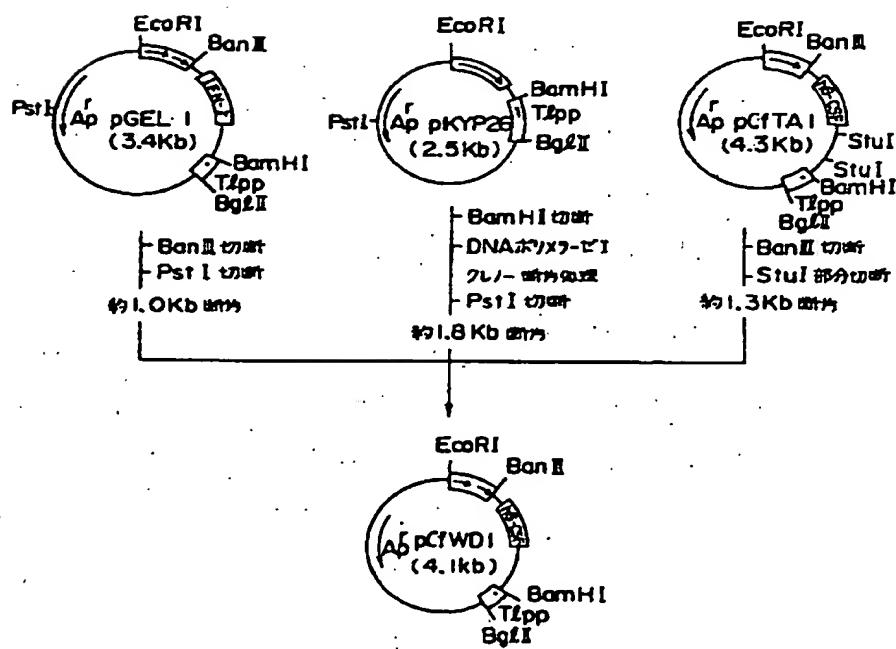
第40図

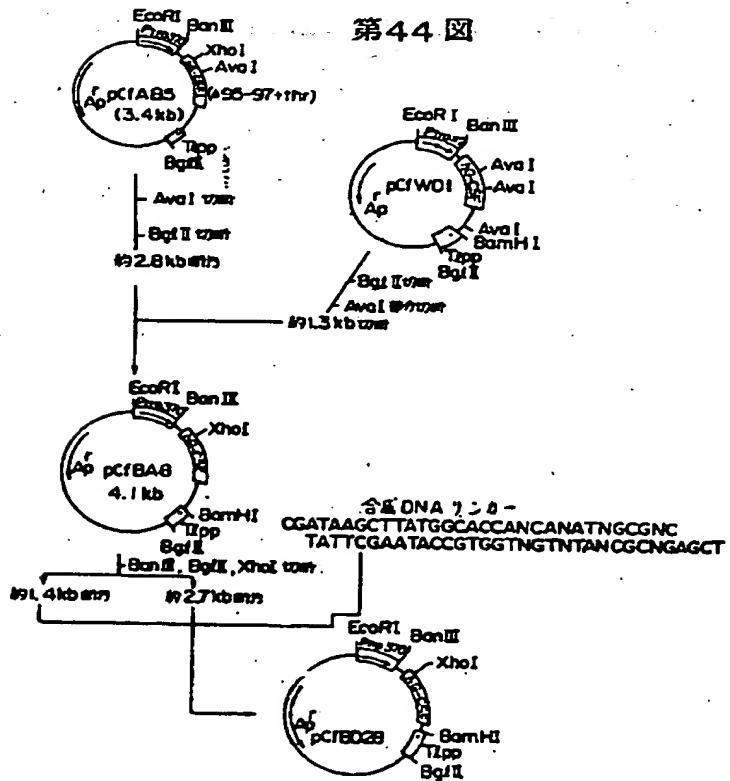
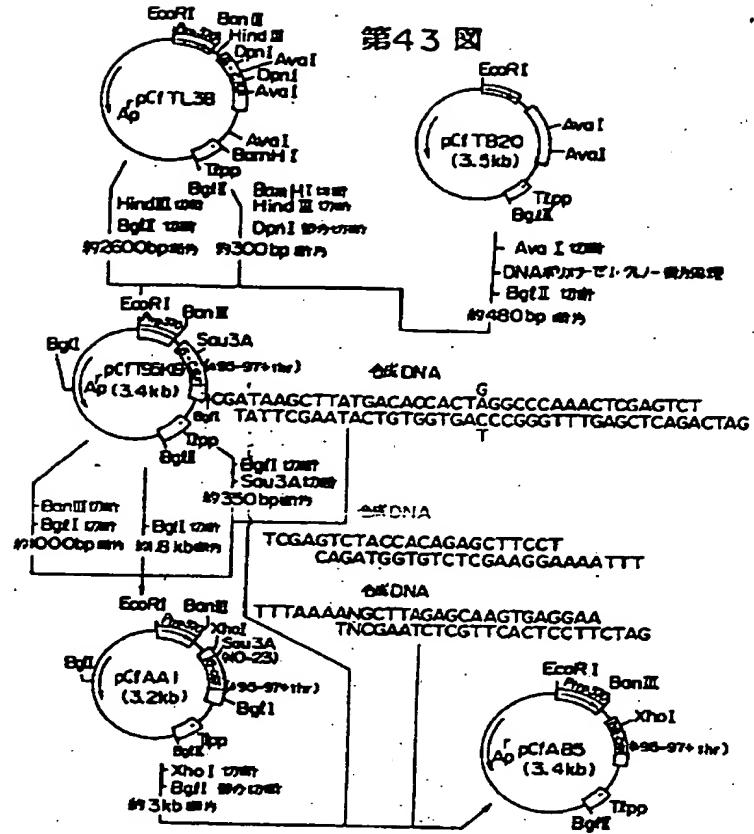


第41図

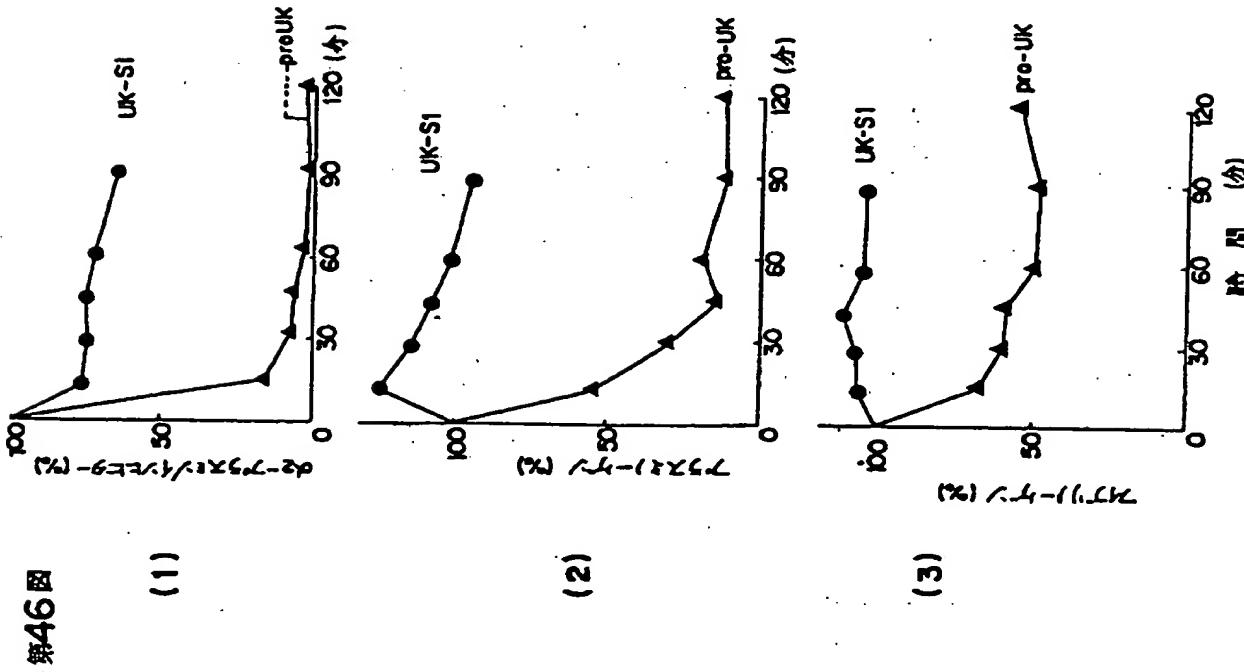
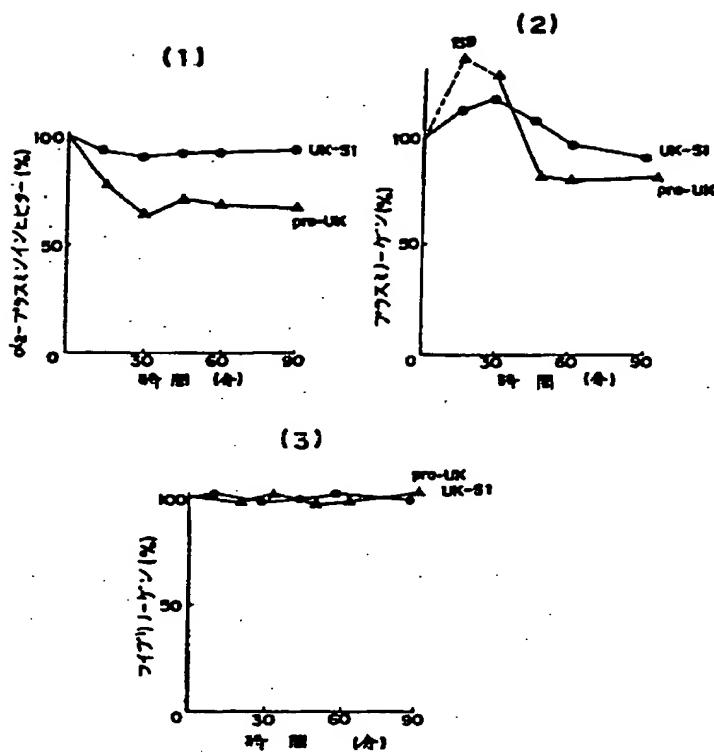


第42図





第45図

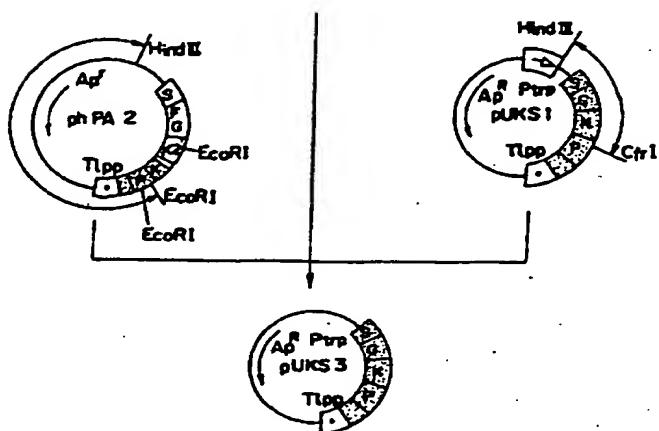


第46図

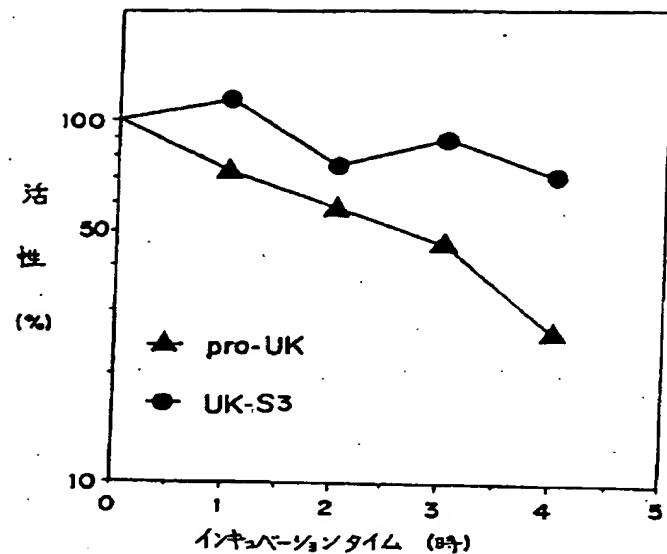
第49図

第47図

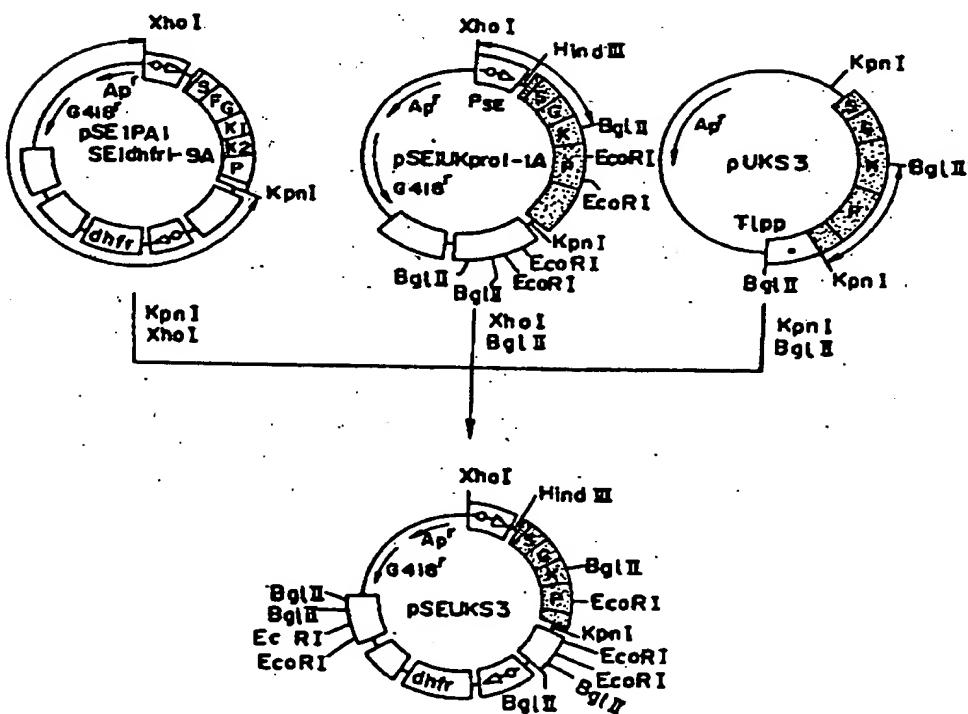
GGCCAA AAG ACT ATT CGA ACG CGT TTT AAG ATT ATT GGG GGA G
TT TTC TGA TAA GCT TGC GCA AAA TTC TAA TAA CCC CCT CTT AA



蛋白濃度 10 μg/ml, 70°C, 4 h

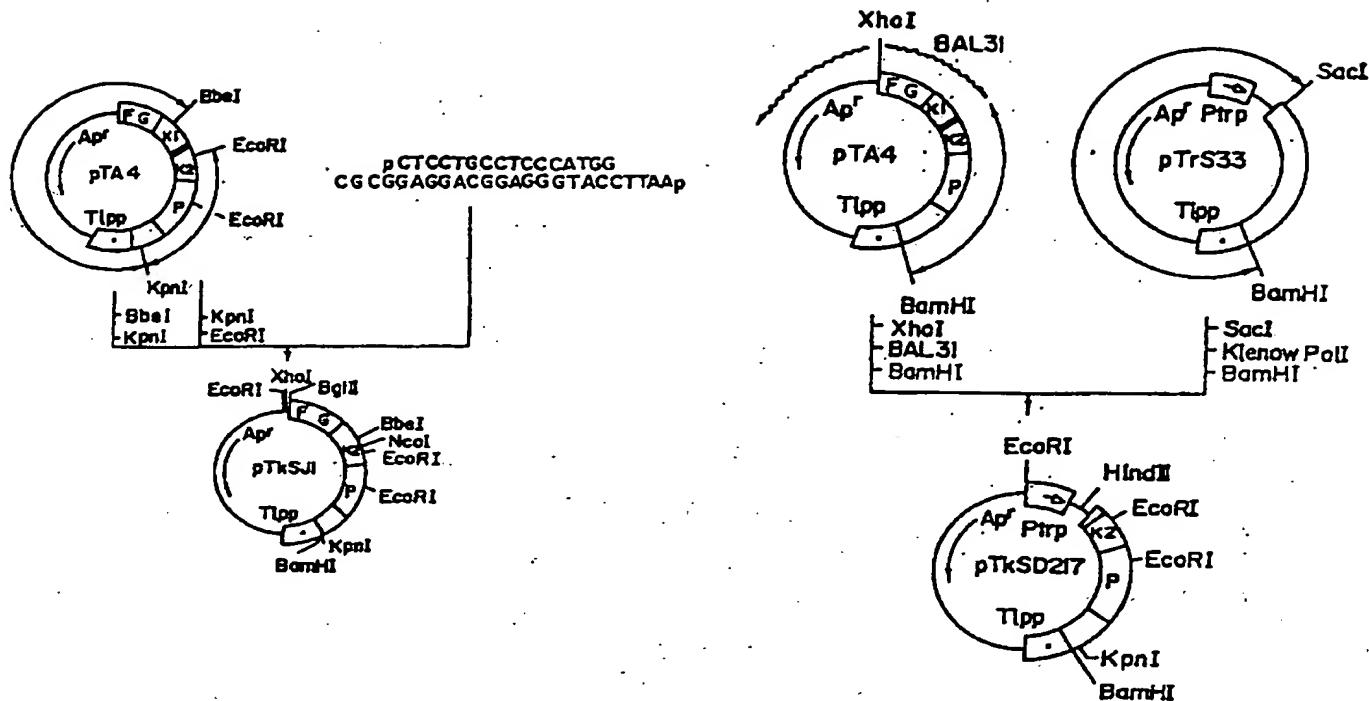


第48図

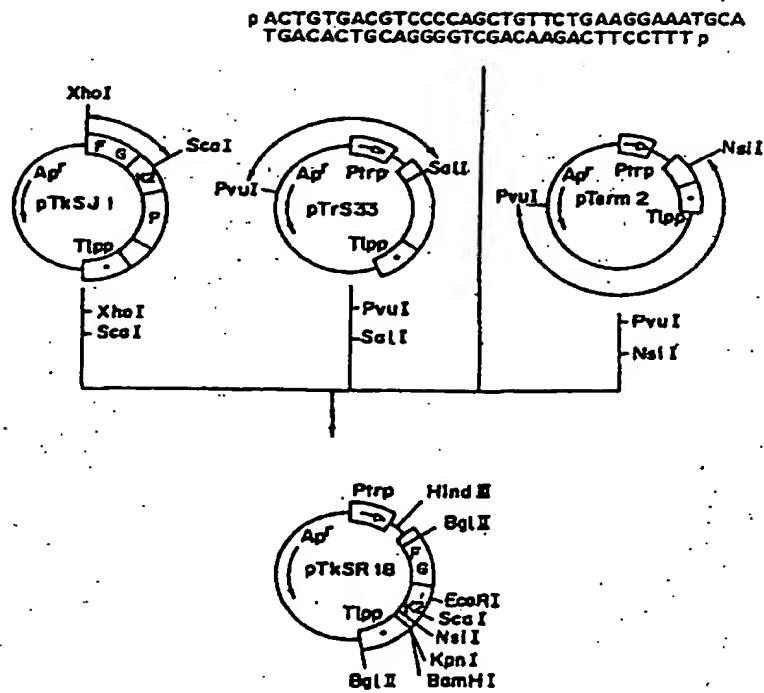


第52圖

第50圖

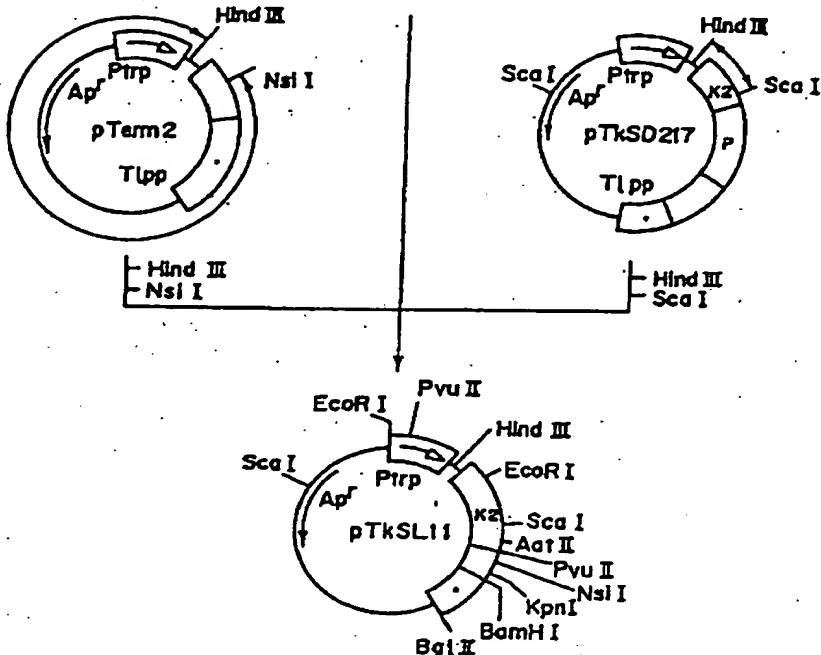


第51圖

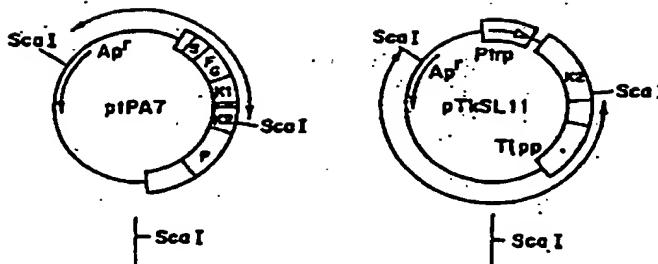


第53図

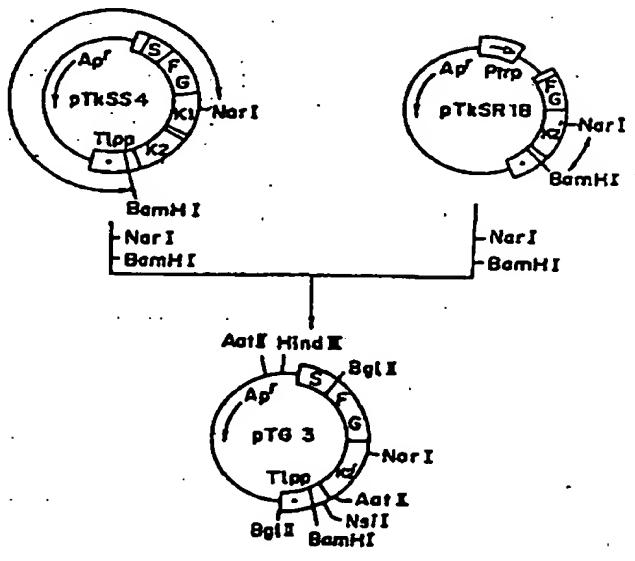
PACTGTGACGTCCCCAGCTGTTCTGAAGGAAATGCA
TGACACTGCAGGGTCGACAAGACTTCCTT^p



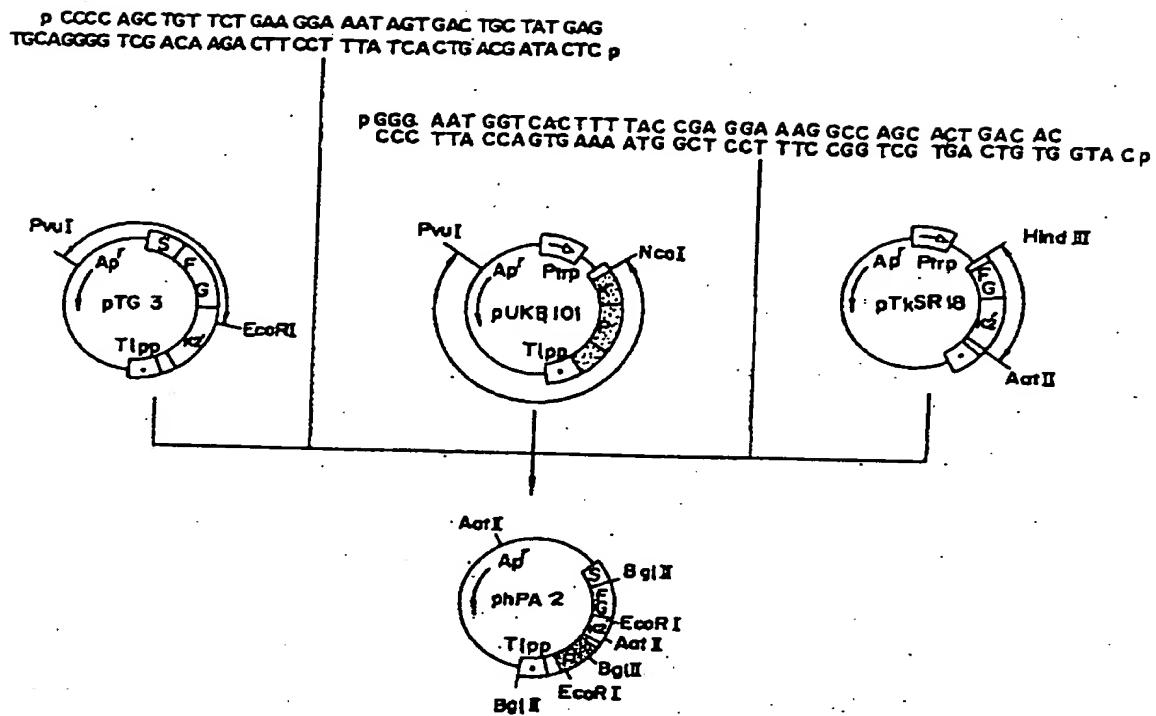
第54図



第55図



第56回



第1頁の続き

⑤Int.Cl.	識別記号	序内整理番号
C 12 N	1/21 5/10 9/64 15/27 15/58 15/70 15/85	Z 7823-4B
C 12 P	21/02	
/(C 12 N	1/21	
C 12 R	1:19)	
(C 12 P	21/02	
C 12 R	1:19)	
(C 12 P	21/02	
C 12 R	1:91)	
Z N A	H	8214-4B
	C	8214-4B

手続補正 (方式)

平成 2 年 1 月 23 日

特許庁長官署



1. 事件の表示

平成1年特許願第253097号

2. 発明の名称

新規ポリペプチド

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

郵便番号 100

住 所 東京都千代田区大手町一丁目6番1号

名 称 (102) 協和園器工業株式会社

(TEL: 03 - 282 - 0036)

代表者 加藤 錠夫



4. 補正命令の日付

平成1年12月12日 (発送日: 同1年12月26日)

5. 補正の対象

図面

6. 補正の内容

願書に最初に添付した図面の添書・別紙のとおり
(内容に変更なし)

方文書 (空)

